

MARCELA SOUZA E FREITAS

**USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DA REAÇÃO
INFLAMATÓRIA UTERINA DE JUMENTAS INSEMINADAS COM SÊMEN
ASININO CRIOPRESERVADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva

Coorientadora: Cristina Mattos Veloso

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

F866u
2024
Freitas, Marcela Souza e, 1998-
 Uso do plasma rico em plaquetas no tratamento da reação
inflamatória uterina de jumentas inseminadas com sêmen asinino
criopreservado / Marcela Souza e Freitas. – Viçosa, MG, 2024.
 1 dissertação eletrônica (102 f.): il. (algumas color.).

 Orientador: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Zootecnia, 2024.

 Inclui bibliografia.

 DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.368>

 Modo de acesso: World Wide Web.

 1. Jumentos - Melhoramento genético. 2. Sêmen -
Criopreservação. 3. Endometrite. I. Silva, Yamê Fabres Robaina
Sancler da, 1987-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia. III. Título.

CDD 22. ed. 636.1820821


MARCELA SOUZA E FREITAS

**USO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS NO TRATAMENTO DA REAÇÃO
INFLAMATÓRIA UTERINA DE JUMENTAS INSEMINADAS COM SÊMEN
ASININO CRIOPRESERVADO**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do Título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de fevereiro de 2024.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **MARCELA SOUZA E FREITAS**
Data: 23/07/2024 08:31:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcela Souza e Freitas
Autora

Documento assinado digitalmente
 **YAME FABRES ROBAINA SANCLER DA SILVA**
Data: 23/07/2024 10:11:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família por todo amor e incentivo. À minha mãe Welnia, por nunca medir esforços em me proporcionar as melhores oportunidades e por sempre acreditar e confiar em mim. Você é minha fonte de inspiração e motivação constante. À minha irmã Larissa, a emoção da minha razão e minha companheira de vida desde que nasci. Ao meu pai Brás, que apesar da distância, consigo senti-lo sempre pertinho de mim aquecendo meu coração.

Ao meu namorado Rômulo, pelo companheirismo, apoio constante e incentivos que sempre me proporciona. Agradeço por toda ajuda durante todas as fases do mestrado e pela sua paciência e compreensão. Tenho sorte por ter você ao meu lado compartilhando sonhos, vitórias e aprendizados. Te amo!

À minha orientadora Yamê, pela dedicação, incentivo, confiança, disponibilidade e compromisso. Estou profundamente grata pela oportunidade concedida e ansiosa em estender nossa parceria no futuro.

Agradeço também à minha coorientadora Cristina, pelo apoio, paciência e confiança depositada em mim desde o primeiro dia. Obrigada por todo carinho, afeto e compreensão.

Ao Cristian, por todos ensinamentos e conhecimentos compartilhados desde os meus dias como estagiária. Obrigada pelo apoio durante o mestrado e por sempre estar disponível para me ajudar, confortar e aconselhar.

À Carolina Fontes, Lorraine Costa e Matheus Vilela, meus amigos e mestres, agradeço por todos conhecimentos compartilhados e cada conselho pessoal e profissional proporcionado. Vocês são fontes de inspiração! Em especial, gostaria de estender meus agradecimentos à Carol pela companhia durante dias e noites de trabalho, pelo ombro amigo e por todos os valiosos ensinamentos.

À UEPE em Equideocultura da UFV, lugar que tenho imenso carinho, agradeço pela concessão dos animais, pela infraestrutura disponível e por todo amparo durante o período experimental. Agradeço a todos os estagiários que se empenharam durante esse período, contribuindo para a realização da pesquisa e aos funcionários por todo auxílio no manejo dos animais. Muito obrigada por todo esforço, dedicação e colaboração!

Ao Departamento de Zootecnia da UFV, seus professores e funcionários pelo compartilhamento de conhecimento, pela troca de experiências enriquecedoras e pelo ambiente acadêmico que proporcionaram ao longo deste percurso.

À Universidade Federal de Viçosa, minha segunda casa há mais de uma década, agradeço profundamente pela oportunidade de realizar a pós-graduação. É com imensa gratidão que reconheço a importância desta instituição em minha trajetória acadêmica e pessoal.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – Código de Financiamento APQ-02167-22.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, seja com palavras de encorajamento, apoio técnico ou simples gestos de amizade. Cada um de vocês teve um papel fundamental nesta jornada, obrigada!

RESUMO

FREITAS, Marcela Souza e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Uso do plasma rico em plaquetas no tratamento da reação inflamatória uterina de jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado.** Orientadora: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva. Coorientadora: Cristina Mattos Veloso.

Os asininos (*Equus asinus*) são animais rústicos e resistentes, muito utilizados como animais de carga, para atividades agropecuárias e tração. Há uma elevada demanda por estudos acerca desta espécie, dada sua importância social, seu uso na produção de muares e pelo déficit demográfico enfrentado por sua população, havendo risco de extinção de algumas raças em nível mundial. Visando a conservação genética de espécies em risco de extinção e o melhoramento genético de animais de produção, a criopreservação seminal tem sido aplicada extensivamente em programas de reprodução assistida. No entanto, o uso do sêmen congelado de machos asininos consiste em um entrave à conservação e melhoramento desta espécie, pois apesar de apresentar alta qualidade após o descongelamento e resultados satisfatórios de fertilidade em éguas, o uso desta biotécnica produz índices insatisfatórios em jumentas. Tais resultados podem estar relacionados com a interação entre o sêmen e o ambiente uterino, apresentando diferenças na resposta imunológica uterina entre as duas espécies. Desta forma, é importante a compreensão dos mecanismos do processo inflamatório uterino das jumentas e a avaliação de tratamentos pré e pós inseminação artificial, que podem modular esse processo, com o intuito de alcançar melhores taxas reprodutivas nessas fêmeas. O estudo 1 tem como objetivo comparar sete protocolos manuais para a preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) na espécie asinina. O estudo 2 tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento local do PRP na reação inflamatória uterina e fertilidade de fêmeas asininas inseminadas com sêmen criopreservado de asininos.

Palavras-chave: Endometrite; Fertilidade; Sêmen congelado; PRP.

ABSTRACT

FREITAS, Marcela Souza e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2024. **Use of platelet-rich plasma in the treatment of uterine inflammatory response of jennies inseminated with frozen donkey semen.** Adviser: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva. Co-adviser: Cristina Mattos Veloso.

Donkeys (*Equus asinus*) are rustic and resistant animals, widely used as pack animals, for agricultural activities and traction. There is a high demand for studies on this species, given its social importance, its use in the production of hybrids and the demographic deficit faced by its population with some breeds at risk of extinction worldwide. Aiming at the genetic conservation of endangered species and the genetic improvement of production animals, seminal cryopreservation has been extensively applied in assisted reproduction programs. However, the use of frozen semen from donkeys is an obstacle to the conservation and improvement of this species, because despite presenting high quality after thawing and satisfactory fertility results in mares, the use of this biotechnology produces unsatisfactory rates in jennies. These results may be related to the interaction between semen and the uterine environment, showing differences in the uterine immune response between the two species. Therefore, understanding the mechanisms of the uterine inflammatory processes in jennies and to evaluate treatments before and after artificial insemination that can modulate this process are important to achieve better reproductive rates in these females. Study 1 aims to compare seven manual protocols for the preparation of platelet-rich plasma (PRP) in the donkey species. Study 2 aims to evaluate the effect of local PRP treatment of uterine inflammatory response and fertility of jennies inseminated with frozen donkey semen.

Key-words: Endometritis; Asinus; Fertility; Frozen semen; PRP.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Esquematização dos protocolos (P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7) utilizados para produção do plasma rico em plaquetas (PRP) em asininos. 51
- Figura 2.** Medianas e intervalos interquartis da concentração de leucócitos (A), hemácias (B) e agregados plaquetários (C) por microlitro (μl) de PRP em cada protocolo testado. 53
- Figura 3.** Delineamento da fase experimental 1. TP: momento prévio à IA e ao tratamento com PRP. T0: momento da IA. T6: 6 horas após IA. T24: 24 horas após IA. T48: 48 horas após IA. D5: 5 dias após a IA. PRP: plasma rico em plaquetas. IA: inseminação artificial. US: ultrassonografia. 70
- Figura 4.** Delineamento da fase experimental 2. TP: momento prévio à IA e ao tratamento com PRP. T0: momento da IA. D14: 14 dias após a IA. PRP: plasma rico em plaquetas. IA: inseminação artificial. DG: Diagnóstico de gestação. 71
- Figura 5.** Protocolo para preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) utilizado no presente estudo. 73
- Figura 6.** Médias e erros-padrão da área total (mm^2) (escala de cinza) avaliada previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS. Comparação entre grupos das regiões de corno inseminado (A), corno não inseminado (B) e corpo uterino (C). Comparação entre tempos dentro do mesmo grupo das regiões de corno inseminado (D), corno não inseminado (E) e corpo uterino (F).. 79
- Figura 7.** Médias e erros-padrão da porcentagem da área de pixels coloridos (vascularização) avaliada previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS. Comparação entre grupos das regiões de corno inseminado (A), corno não inseminado (B) e corpo uterino (C). Comparação entre tempos dentro do mesmo grupo das regiões de corno inseminado (D), corno não inseminado (E) e corpo uterino (F)..... 80
- Figura 8.** Médias e erros-padrão da porcentagem de células inflamatórias totais e neutrófilos avaliadas previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS. Comparação entre grupos da porcentagem de células inflamatórias totais (A) e neutrófilos (B). Comparação entre tempos dentro do mesmo grupo da porcentagem de células inflamatórias totais (C) e neutrófilos (D). 82
- Figura 9.** Comparação de imagens de citologia uterina (aumento de 400x) de jumentas, em coletadas realizadas previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da inseminação artificial com sêmen asinino congelado..... 84
- Figura 10.** Médias e erros-padrão da contagem de neutrófilos no estrato compacto (A) e da porcentagem da área de colágeno (F) 48 horas após IA. Medianas e intervalos interquartis da

contagem de neutrófilos no estrato esponjoso (B) e dos escores de eosinófilos (C), linfócitos (D) e fibrose (E) 48 horas após IA. 85

Figura 11. Endométrio de jumenta 48 horas após a IA. A: Endométrio praticamente sem alterações (100x). B: Infiltração de eosinófilos e neutrófilos severa no estrato compacto (400x). C: Presença de fibrose periglandular no estrato compacto (400x). D: Observa-se em amarelo as glândulas e em vermelho as fibras colágenas no estrato compacto (100x). Lâminas coradas com Hematoxilina Eosina (A, B e C) e Picro Sirius Red (D). 86

Figura 12. Médias e erros-padrão da concentração sérica de progesterona (ng/mL) avaliada 5 dias após a inseminação artificial com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS. 87

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variação de força, tempo e número de centrifugações entre os grupos.50
- Tabela 2.** Médias e erros-padrão das médias da concentração de plaquetas por microlitro (μl) de PRP em cada grupo testado.52
- Tabela 3.** Medianas e intervalos interquartis dos escores de edema endometrial e de líquido intrauterino das jumentas, avaliados previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS..... 78
- Tabela 4.** Medianas e intervalos interquartis da porcentagem de eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos em esfregaços de citologia uterina das jumentas, avaliadas previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS..... 83
- Tabela 5.** Médias e erros-padrão da taxa de fertilidade (%) aos 14 dias após inseminação artificial com sêmen asinino congelado entre os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS..... 88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
µL	Microlitro
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AINE	Anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	Análise de variância
CBRA	Colégio brasileiro de reprodução animal
CEUAP	Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção
cm	Centímetro
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CT	Grupo controle
CPDA	Citrato-fosfato-dextrose-adenina
CXCL-8	Interleucina 8
D5	Cinco dias pós ovulação
D14	Quatorze dias pós ovulação
D16	Dezesseis dias pós ovulação
DC	Protocolos com dupla centrifugação
DG	Diagnóstico de gestação
DMF	Dimetilformamida
DTT	Ditiotreitol
E2	Estradiol
EC	Estrato compacto
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
EDN	Neurotoxina derivada de eosinófilos
EE	Estrato esponjoso
EG	Etilenoglicol
EPCC	Endometrite persistente pós-cobertura
EPO	Peroxidase eosinofílica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Food and Agriculture Organization

FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
h	Horas
HE	Hematoxilina e Eosina
IA	Inseminação artificial
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL-1	Interleucina 1
IL-13	Interleucina 13
IL-3	Interleucina 3
IL-33	Interleucina 33
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IM	Intramuscular
iNOS	Proteína óxido nítrico-sintase induzida
kg	Quilogramas
kHz	Kilo-hertz
LIU	Líquido intrauterino
LOX	Lipoxigenase
MBP	Proteína eosinofílica básica maior
mg	Miligramas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MHz	Mega-hertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
N ₂	Nitrogênio líquido
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de crescimento neural
ng	Nanogramas
NO	Óxido nítrico
n°	Número
P4	Progesterona

PAMP	Padrão molecular associado a patógenos
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM	Molécula de adesão celular endotelial de plaquetas
PGE	Prostaglandina E
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PMN	Célula polimorfonuclear
PPP	Plasma pobre em plaquetas
PRP	Plasma rico em plaquetas
PRP PRÉ	Grupo com tratamento com PRP antes da IA
PRP PRÉ+PÓS	Grupo com tratamento com PRP antes e após a IA
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
PS	Plasma seminal
PSB	Tampão-fosfato
PSR	Picrosirius Red
rpm	Rotações por minuto
ssp	Várias espécies de gêneros
T0	Momento da detecção da ovulação e inseminação artificial
T24	Vinte e quatro horas pós inseminação artificial
T48	Quarenta e oito horas pós inseminação artificial
T6	Seis horas pós inseminação artificial
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
TC	Protocolos com tripla centrifugação
TP	Avaliação anterior a inseminação artificial e tratamento com PRP
TRL	Receptor do tipo Toll-like
UFV	Universidade Federal de Viçosa
US	Ultrassonografia

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Uso do sêmen congelado.....	16
2. Endometrite persistente pós-cobertura (EPPC).....	20
3. Terapias para Endometrite persistente pós-cobertura (EPPC)	24
4. Plasma Rico em Plaquetas (PRP).....	26
OBJETIVOS	30
1. Objetivo geral.....	30
2. Objetivos específicos.....	30
HIPÓTESES.....	30
REFERÊNCIAS	31
ARTIGO 1.....	44
1. INTRODUÇÃO	47
2. MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1.Aspectos éticos do estudo	49
2.2.Animais e local de pesquisa.....	49
2.3.Processamento do PRP	49
2.4.Avaliação das amostras.....	51
2.5.Análises estatísticas	52
3. RESULTADOS.....	52
4. DISCUSSÃO.....	54
5. CONCLUSÕES.....	57
REFERÊNCIAS	58
ARTIGO 2.....	63
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1.Aspectos éticos do estudo	67
2.2.Animais e local de pesquisa.....	68
2.3.Delineamento experimental	68
2.4.Congelamento do sêmen	71
2.5.Controle do ciclo estral e inseminação artificial	72
2.6.Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP).....	73
2.7.Avaliações.....	73
2.7.1. Edema endometrial, líquido intrauterino e perfusão sanguínea uterina	73
2.7.2. Citologia esfoliativa endometrial	74

2.7.3. Biópsia endometrial para histopatologia e quantificação de colágeno.....	75
2.7.4. Concentração sérica de progesterona	76
2.7.5. Diagnóstico de gestação	76
2.8. Análises estatísticas	77
3. RESULTADOS	77
3.1. Edema endometrial e líquido intrauterino.....	77
3.2. Área total da região uterina e perfusão sanguínea uterina	79
3.3. Citologia esfoliativa endometrial	81
3.4. Histopatologia e quantificação de colágeno.....	85
3.5. Concentração sérica de progesterona	87
3.6. Taxa de fertilidade	87
4. DISCUSSÃO.....	88
5. CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS	96

INTRODUÇÃO

Os equídeos, animais da família *Equidae*, compreendem a espécie *Equus caballus* (cavalo doméstico), a espécie *Equus asinus* (jumento doméstico) e os muares, que são animais híbridos provenientes do cruzamento entre ambas as espécies. Os asininos são animais rústicos e resistentes, muito utilizados para atividades agropecuárias, transporte de cargas e tração. Além disso, são utilizados para a produção de animais híbridos (muares), mercado em ascensão e cada vez mais valorizado no Brasil (BURDEN & THIEMANN, 2015; CINTRA, 2011). No entanto, como consequência do abate indiscriminado, devido a importância econômica do couro e subprodutos e aumento da mecanização do setor agrícola, observa-se nos últimos anos um declínio no número de animais no mundo, causando perda de variabilidade genética e risco de extinção (CARNEIRO et al., 2018).

A criopreservação do sêmen, que possui como objetivo a preservação do material genético por tempo indeterminado através da estagnação do metabolismo das células espermáticas (HAFEZ et al., 2004; MOREL, 2008; SANCHEZ et al., 2009; BRINSKO et al., 2011), se trata de uma importante biotecnologia para manutenção de um banco genético de espécies ameaçadas. Apesar desta biotecnologia frequentemente apresentar alta qualidade após o descongelamento na espécie asinina, a inseminação artificial (IA) utilizando este sêmen em jumentas produz baixas taxas de fertilidade (0 a 28%) (TRIMECHE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006; VIDAMENT et al., 2009; ROTA et al., 2012; DIAZ-JIMENEZ et al., 2021; COSTA et al., 2023). No entanto, quando o sêmen asinino criopreservado é utilizado para IA em éguas, índices satisfatórios são observados (36 a 54,55%) (OLIVEIRA et al., 2006; VIDAMENT et al., 2009; CANISSO et al., 2011; COSTA et al., 2023).

Por si só, o uso do sêmen congelado produz uma resposta inflamatória mais intensa quando comparado ao fresco ou refrigerado. Porém, foi demonstrado que as fêmeas asininas apresentam uma reação inflamatória pós IA com sêmen congelado mais intensa do que a espécie equina (COSTA et al., 2023), tais resultados podem estar relacionados com a interação do sêmen criopreservado com o ambiente uterino, apresentando diferenças na resposta imunológica uterina entre as duas espécies (WILDT et al., 1995; VENDRAMINI et al., 1998; VIDAMENT et al., 2009; TABERNER et al., 2008; RENNER-MARTIN et al., 2009; CAMILLO et al., 2010; CANISSO et al., 2019).

Este mecanismo inflamatório ocorre de forma fisiológica após cobertura ou inseminação artificial com o objetivo de eliminar espermatozoides restantes, microrganismos e outros produtos, como debris celulares e plasma seminal introduzidos no útero para deixar o

ambiente uterino adequado para receber o embrião (TROEDSSON et al., 1999; LE BLANC et al., 2009). Porém, quando a inflamação se torna persistente, conhecida como endometrite persistente pós cobertura (EPPC), a fertilidade pode ser afetada devido ao ambiente uterino embriotóxico e à luteólise prematura, em virtude do aumento da produção prostaglandinas (NEELY et al., 1979; WATSON, 2000a; TROEDSSON et al., 2001; KATILA, 2012).

Desta forma, tem-se a importância de explorar não só os efeitos do processo de criopreservação e os seus componentes, como também as interações entre o sêmen e o trato reprodutor feminino para viabilizar o uso do sêmen descongelado na espécie asinina. O tratamento tradicional utilizado na prática equina para endometrite faz o uso da combinação de diversas terapias, como lavagem uterina, agentes ecbólicos, anti-inflamatórios e antibióticos, caso necessário. Por não atuar diretamente no processo inflamatório e apenas minimizar os fatores relacionados à sua instalação, as terapias tradicionais são consideradas de suporte (LEBLANC et al., 2010; CANISSO et al., 2016). Tratamentos alternativos também estão sendo desenvolvidos, como por exemplo acupuntura, terapia com ozônio, plasma rico em plaquetas (PRP), que podem ser associados ou não às terapias tradicionais (SCHOFIEL, 2008; SCOGGIN, 2016; SWIFT et al., 2020; ALMEIDA et al., 2021; SEGABINAZZI et al., 2021).

Na medicina veterinária, o PRP tem sido amplamente utilizado no auxílio ao tratamento de lesões musculoesqueléticas (CARMONA et al., 2007; ARGÜELLES et al., 2008; KIM et al., 2009; MAIA, 2009; BOSCH et al., 2011; SILVA et al., 2013; PEREIRA et al., 2019; MONTANO et al., 2021). Além disso, alguns estudos demonstraram efeito benéfico desta terapia na redução da reação inflamatória pós cobertura em éguas (METCALF, 2014; REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2017; SEGABINAZZI et al., 2021; ANDINO et al., 2023) e aumento das taxas de fertilidade dessas fêmeas (METCALF, 2014; SEGABINAZZI et al., 2017). Em jumentas, FARGHALI et al. (2022) relataram que infusões intrauterinas de PRP na fase de diestro em jumentas com endometrite aguda bacteriana restauraram a aparência normal do endométrio e reduziram o processo inflamatório nestas fêmeas. Apesar desse resultado positivo, o efeito do PRP não foi ainda demonstrado em endometrite persistente pós cobertura em jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Uso do sêmen congelado

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia reprodutiva utilizada em diversas espécies com o objetivo de preservação do material genético por tempo indeterminado através

da estagnação do metabolismo das células espermáticas. Desta forma, permite otimizar a utilização de machos reprodutores, minimizar a propagação de doenças, eliminar barreiras geográficas, facilitando o comércio entre propriedades distantes e o aumento da variabilidade genética (LOOMIS, 2001; SANCHEZ et al., 2009; BRINSKO et al., 2011). Além disso, esta biotecnologia auxilia na conservação de espécies ou raças ameaçadas de extinção, como é o caso de algumas raças asininas (FOLCH & JORDANA., 1997; KUGLER et al., 2008; CARNEIRO et al., 2018).

O uso do sêmen congelado de machos asininos consiste em um entrave à conservação desta espécie, pois apesar de apresentar alta qualidade após o descongelamento (FLORES et al., 2008; ROTA et al., 2012; ORTIZ et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016) e resultados satisfatórios de fertilidade em éguas, o emprego desta biotécnica em jumentas produz índices insatisfatórios de fertilidade. Foram relatadas taxas de fertilidade em éguas inseminadas com sêmen asinino criopreservado variando de 36% a 54,55% (OLIVEIRA et al., 2006; VIDAMENT et al., 2009; CANISSO et al., 2011; COSTA et al., 2023). Enquanto em jumentas, as taxas relatadas foram de 0% a 28% em jumentas (TRIMECHE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006; VIDAMENT et al., 2009; DIAZ-JIMENEZ et al., 2021; COSTA et al., 2023). Alguns estudos conseguiram taxas um pouco mais elevadas (até 36%) ao utilizarem mais de uma inseminação artificial ou associando a IA a algum tratamento (ROTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016). O maior resultado foi alcançado por ROTA et al. (2012), apresentando 61,5% de taxa de fertilidade em jumentas inseminadas com sêmen criopreservado em INRA-96, contendo glicerol como crioprotetor, e realizando a rediluição no pós-descongelamento com plasma seminal seguida de lavagem uterina pós IA. Além disso, foram utilizadas até duas IA por ciclo. Nesse contexto, investigações quanto as particularidades da interação entre o sêmen asinino congelado e o ambiente uterino das fêmeas asininas são necessárias, além de mais estudos quanto aos métodos de processamento empregados no congelamento e na inseminação artificial desse sêmen.

Durante o processo de criopreservação, o plasma seminal é retirado e o é sêmen submetido a baixas temperaturas, visando reduzir o metabolismo espermático, prolongando sua sobrevivência. No entanto, este processo pode causar danos criogênicos às células espermáticas, diminuindo sua qualidade pós descongelamento e longevidade no trato reprodutor feminino (WATSON et al., 1995; WATSON, 2000b). Diante disso, diluentes e crioprotetores são utilizados para proteção química e física dos espermatozoides (NASH, 1996; ARRUDA, 2000; PAPA et al., 2008; GRAHAM, 2011) e o manejo das fêmeas se torna mais intenso para garantir que a inseminação ocorra próximo ao momento da ovulação (LOOMIS, 2001). Todavia, como

estas técnicas foram originalmente desenvolvidas para a espécie equina, a transferência e o uso em outras espécies, como a asinina, sem levar em consideração diferenças fisiológicas e anatômicas podem afetar os resultados, ainda que as espécies apresentem muitas semelhanças (WILDT et al., 1995; VENDRAMINI et al., 1998; VIDAMENT et al., 2009; TABERNER et al., 2008; RENNER-MARTIN et al., 2009; CAMILLO et al., 2010; CANISSO et al., 2019).

Em relação ao fator sêmen, a resposta inflamatória uterina após reprodução é observada de forma mais exacerbada ao utilizar sêmen criopreservado em comparação ao fresco ou refrigerado, podendo estar associada não só à presença das células espermáticas, mas também à remoção do plasma seminal, aos componentes dos diluentes, como os crioprotetores, e à quantidade de espermatozoides inseminados (KOTILAINEN et al., 1994; WATSON, 2000b; TROEDSSON et al., 2001; FIALA et al., 2007; KATILA, 2012; CAZALES et al., 2018). Pesquisadores sugeriram algumas hipóteses de que os diluentes, apesar de fundamentais durante a criopreservação, podem apresentar maior toxicidade à espécie asinina do que equina. Os diluentes e seus componentes podem afetar tanto as células espermáticas e a qualidade do sêmen, quanto o trato reprodutor feminino, induzindo uma reação inflamatória uterina intensa, podendo exercer efeito negativo na fertilidade (TRIMECHE et al., 1998; VIDAMENT et al., 2009).

Alguns estudos demonstraram o efeito negativo do glicerol sobre a taxa de fertilidade em éguas (PACE & SULLIVAN, 1975; PICKETT et al., 1975; PALMER, 1984; BEDFORD et al., 1995). Em 1998, TRIMECHE et al. observaram que as gestações em jumentas foram obtidas apenas quando o glicerol foi removido após o descongelamento, antes da IA. A partir da mesma hipótese, VIDAMENT et al. (2009) avaliaram o efeito dos crioprotetores nas taxas de prenhez em fêmeas equídeas e constataram que a adição de glicerol ao sêmen pode danificar as células espermáticas e, conseqüentemente, apresentar efeito deletério sobre a motilidade e a taxa de fertilidade e que esta toxicidade ocorre em concentrações mais baixas para espermatozoides asininos do que equinos. No mesmo estudo, foi relatado também que a adição de 2,2% de glicerol ao sêmen resfriado de jumentos diminuiu de 63% para 0% a taxa de prenhez em jumentas.

Outros crioprotetores foram testados (dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dimetilacetamida e etilenoglicol), mas as taxas de prenhez obtidas em jumentas não foram mais satisfatórias ao utilizar o sêmen criopreservado, colocando em xeque a teoria de que o glicerol seria o responsável pelo baixo sucesso desta biotécnica (OLIVEIRA et al., 2006; VIDAMENT et al., 2009; ROTA et al., 2012). OLIVEIRA et al. (2006) compararam diferentes crioprotetores e combinações, mas apesar da boa motilidade espermática e de taxa de concepção satisfatória

em éguas (40%), a IA pré e pós-ovulação não resultaram em prenhez positiva em jumentas em todos os diluentes testados (2% dimetilsulfóxido + 2% dimetilformamida; 3% dimetilformamida; 2% dimetilacetamida + 2% glicerol; 3% dimetilacetamida; 3% glicerol + 2% dimetilformamida; 3% dimetilsulfóxido + 2% glicerol). Da mesma forma, VIDAMENT et al. (2009) na tentativa de melhorar a fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen congelado, testaram a utilização de 2,1% de glicerol ou 2,2% de dimetilformamida no congelamento e demonstram que ambos os crioprotetores resultaram em baixas taxas de prenhez (0% e 10%, respectivamente) e que apresentam resultados similares. Comparando glicerol e etilenoglicol, ROTA et al. (2012) não encontraram diferenças na motilidade espermática pós-descongelamento e nas taxas de fertilidade usando concentração molar semelhante das duas moléculas (2,2% glicerol ou 1,4% etilenoglicol). No entanto, quando foram utilizados na mesma concentração (5%), a motilidade foi significativamente menor com etilenoglicol.

A remoção do plasma seminal (PS) também pode contribuir para aumento da inflamação uterina por conter substâncias que modulam a inflamação, alterando a quimiotaxia e a adesão às células espermáticas. Apesar disso, a adição de plasma seminal ao sêmen tem resultados contraditórios. Em éguas, foi relatado por ALGHAMDI et al. (2005) que a adição de plasma seminal ao sêmen descongelado melhorou a fertilidade, mas nenhum efeito significativo foi observado por PANZANI et al. (2009). Estudos também descreveram aumento de células inflamatórias no útero após IA com a presença de plasma seminal (FIALA et al., 2002; PORTUS et al., 2005; PALM et al., 2008). Desta forma, sugeriu-se então que o PS sendo pró-inflamatório logo após a IA, exerce efeito diminuindo a intensidade e encurtando o período inflamatório em éguas (KATILA, 2012).

Um estudo envolvendo a adição de plasma seminal ao sêmen asinino descongelado identificou aumento na proporção de PMNs no endométrio e não encontrou diferença significativa na taxa de fertilidade de jumentas, porém observou tendência de melhoria desta taxa (ROTA et al., 2012). Apesar de VILÉS et al. (2013b) também relatarem grande número de PMNs no endométrio de jumentas após IA com sêmen congelado, não foi observada diferença significativa quanto à adição ou não de plasma seminal.

A biotecnologia de criopreservação do sêmen tem sido cada vez mais utilizada, estimulando as pesquisas e aprimoramento acerca do assunto em diversas espécies. Porém, ainda há a necessidade de mais estudos relacionados ao tema para os asininos com o intuito de viabilizar o uso do sêmen descongelado nesta espécie. Como demonstrado em outros trabalhos, fica claro que as taxas reprodutivas das jumentas de após IA com sêmen congelado de jumento são menores do que em éguas. Por isso, tem-se a importância de explorar não só os efeitos do

processo de criopreservação e os seus componentes, como também as interações entre o sêmen e o trato reprodutor feminino.

2. Endometrite persistente pós-cobertura (EPPC)

A endometrite, definida como inflamação do endométrio uterino, é a maior causa da redução da fertilidade em éguas, dentre as patologias do aparelho reprodutor (TROEDSSON, 1999; CANISSO, et al., 2020) e pode ser classificada como aguda ou crônica, infecciosa ou não infecciosa. A endometrite pós cobertura ou pós inseminação artificial é um mecanismo não infeccioso, fisiológico, agudo e transitório, importante para eliminação dos espermatozoides restantes, microrganismos e outros produtos, como debris celulares e plasma seminal introduzidos no útero, com o intuito de prepará-lo para receber o embrião (TROEDSSON et al., 1999; LE BLANC et al, 2009).

Os espermatozoides, demais componentes seminais e possíveis patógenos provenientes da IA ou cópula são reconhecidos pelo sistema imune como invasores, resultando em um processo inflamatório local. Apesar de existirem barreiras físicas ao longo do sistema reprodutor feminino contra a entrada de contaminantes, como a vulva e a cérvix (MALSCHITZKY et al., 2007) ao realizar a IA ou monta natural, tais barreiras são rompidas com a deposição intrauterina do sêmen. O processo inflamatório em questão acontece por meio da rápida resposta antigênica no trato reprodutor feminino, sendo necessária a coordenação eficaz entre a via mecânica e a resposta imune inata para sua resolução (MORRIS et al., 2020). Assim, condições histológicas, anatômicas e fisiológicas que resultam em alteração na depuração mecânica e resposta imune prejudicada podem facilitar a persistência da endometrite, mediante acúmulo de PMNs e líquido intrauterino (TROEDSSON et al., 1999; MAISCHBERGER et al., 2008; LE BLANC & CAUSEY, 2009; WOODWARD et al., 2012; WOODWARD et al., 2013; MORRIS et al., 2020).

A imunidade inata (natural) atua na primeira linha de defesa do organismo ao oferecer resposta imediata, inespecífica, limitada de estímulos e sem capacidade de produção de memória imunológica. O processo inflamatório desencadeado gera liberação de prostaglandinas e citocinas para ativação do endotélio vascular e recrutamento das células do sistema imune, ativação do sistema complemento e da imunidade adaptativa, além de atuar como barreira física aos organismos e partículas invasoras (COLLINS et al., 1999; TROEDSSON et al., 2001; EISENBACH, 2003; KAPLANSKI et al., 2003; KATILA, 2012; CANISSO et al., 2020).

Assim os invasores são reconhecidos e o sistema complemento é ativado (TROEDSSON et al., 2001; TURNER et al., 2012; CANISSO et al., 2020), através dos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células endometriais e das células sentinelas, sendo os receptores do tipo Toll-like (TRLs) os que apresentam a família mais significativa. A ligação do PAMP ao receptor TRL gera uma cascata de sinalização, em que genes para ativação de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, principalmente interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) são ativados (TAKEDA & AKIRA, 2004; TIZARD, 2018). Tais mediadores levam a ativação do endotélio vascular, constrição das arteríolas e dilatação das vênulas no local afetado, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular e o extravasamento de exsudato para o interstício, causando edema local (COLLINS et al., 1999). As alterações vasculares permitem a adesão de leucócitos ao endotélio e migração devido ao gradiente quimiotático para o local inflamado, iniciando as respostas inflamatórias para eliminação do antígeno (DORÉ & SIROIS, 1996; KAPLANSKI et al., 2003; TIZARD, 2018). O início da quimiotaxia ocorre rapidamente após a IA e sua duração deve ser relativamente curta para garantir retorno do endométrio ao estado normal antes de receber o embrião (KATILA, 2012).

Os granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) são caracterizados pela presença de grânulos no citoplasma que contêm uma variedade de proteínas pré-formadas, como citocinas, fatores de crescimento e proteínas principais básicas, importantes para o desempenho de funções imunológicas e que podem ser secretados após ativação. Assim, componentes dos grânulos possuem capacidade citotóxica que atuam na destruição de microrganismos e, no caso de eosinófilos e basófilos, causam reações de hipersensibilidade (ROTHENBERG e HOGAN, 2006; MELO e WELLER et al., 2010; GEERING et al., 2013), porém em excesso podem contribuir para danos teciduais (RAMIREZ et al., 2018; LEHMAN & SEGAL, 2020; WESCHLER et al., 2021). A liberação destes componentes pode ocorrer através da exocitose clássica, em que os grânulos individuais se fundem com a membrana plasmática e descarregam sua carga; por meio da exocitose composta, em que vários grânulos se fundem e depois se fundem com a membrana plasmática; pela degranulação fragmentada, constituída de pequenos componentes dos grânulos que se soltam e se fundem com a membrana plasmática; ou, ainda, por citólise celular (SPENCER et al., 2014). As células mononucleares, monócitos e linfócitos, também têm várias funções efetoras imunológicas, incluindo o reconhecimento de patógenos, com subsequente secreção de citocinas pró-inflamatórias, apresentação de antígenos, contribuem para a remodelação tecidual e cicatrização de feridas, e

também podem contribuir para a resolução da inflamação via citocinas anti-inflamatórias (GUILLIAMS et al., 2018).

Os neutrófilos são as primeiras e mais numerosas células observadas, responsáveis pela fagocitose do antígeno no local inflamado e liberação de mediadores pró-inflamatórios, induzindo ainda mais a inflamação (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; ROSALES, 2018; TIZARD, 2018). KATILA (1995) relatou o aparecimento de neutrófilos a partir de 30 minutos após inseminação artificial com sêmen fresco em éguas. Os níveis mais altos foram observados entre 6 a 12 horas (pico inflamatório) e o retorno às condições normais em até 48 horas (KATILA, 1995; KATILA, 1996; MAISCHBERGER et al., 2008; KATILA, 2012; COSTA et al., 2022). Ao nível de endométrio, os eosinófilos em jumentas podem ser comumente encontrados durante o estro e em maior proporção durante o processo inflamatório após a inseminação (SOKKAR et al., 2001; MIRÓ et al., 2018; COSTA et al., 2023). Apesar do papel destas células ainda não estar elucidado nesta espécie, em éguas a presença de eosinófilos no útero está associada a reações anafiláticas, pneumovagina e infecção fúngica (SLUSHER et al., 1992; SNIDER et al., 2011; VILES et al., 2013a), sendo esta uma diferenciação entre as espécies.

O desenvolvimento, bem como a sobrevivência e a persistência dos leucócitos nos tecidos e sangue são mediados por fatores de transcrição, citocinas promotoras de crescimento e mediadores inibidores de crescimento. As interleucinas IL-5 e IL-3 e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) são os regulares de crescimentos de eosinófilos mais conhecidos (HOGAN et al., 2008; VALENT et al., 2012; ESNAULT & KELLY, 2016). Outras citocinas, como IL-13, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) ou fator de crescimento neural (NGF), também podem contribuir para a diferenciação e maturação de eosinófilos (BACH et al., 1992; HORIE et al., 1997; NOGA et al., 2002). A IL-33 também tem sido estudada por ser um regulador crítico de uma série de processos, incluindo inflamação, vascularização e fibrose e um potente ativador de eosinófilos em termos de desencadear a degranulação e a liberação de superóxido de eosinófilos humanos, segundo CHERRY et al. (2008). Em jumentas, MIRÓ et al. (2020) avaliaram a expressão de IL-33 em amostras de biópsias uterinas e sugeriram que esta citocina pode mediar a infiltração eosinófilos após IA e observaram uma relação direta entre a infiltração de eosinófilos nos tecidos e a expressão desta citocina. Assim, pesquisas envolvendo o papel de citocinas podem fornecer novos alvos terapêuticos para controle da inflamação uterina em jumentas.

Como resultado do processo inflamatório do útero, ocorrem contrações miométriais, como consequência da secreção da prostaglandina F_{2α}, para promover a limpeza uterina através

da via mecânica, enquanto o sistema linfático atua promovendo retorno dos fluidos dos espaços intersticiais para o sangue, retirando os componentes nocivos (TROEDSSON, 1999; HURTGEN, 2006; LE BLANC et al., 2009; CANISSO et al., 2020). O controle do processo inflamatório depende do equilíbrio entre os mediadores pró e anti-inflamatórios. Assim, citocinas com atuação anti-inflamatória atuam proporcionando inibição da produção e competição por receptores de mediadores pró-inflamatórios ou morte celular (OPAL et al., 2000).

As fêmeas podem ser classificadas como suscetíveis ou resistentes à EPPC, conforme sua capacidade de resolução da inflamação em 48 horas após a cobertura ou IA (LEBLANC et al., 1994; TROEDSSON et al., 1994; KATILA, 1995). Quando a endometrite se torna persistente, a fertilidade pode ser afetada, devido à incompatibilidade do ambiente uterino (neutrofilia persistente, acúmulo de líquido intrauterino e produção de citocinas inflamatórias) para manutenção da gestação e devido à luteólise prematura, em virtude do aumento da produção prostaglandinas induzido pela inflamação (NEELY et al., 1979; WATSON, 2000a; TROEDSSON et al., 2001; KATILA, 2012). Alguns estudos demonstraram que éguas suscetíveis apresentavam níveis basais de citocinas pró-inflamatórias mais elevados que éguas resistentes, sugerindo um equilíbrio inadequado entre moléculas pró e anti-inflamatórias. Enquanto as citocinas pró-inflamatórias diminuíram para níveis basais em 6 horas após IA devido a um aumento de citocinas anti-inflamatórias em éguas resistentes, estes níveis permaneceram elevados até 24 horas, relacionado a produção defeituosa de citocinas anti-inflamatórias, em éguas suscetíveis (KATILA, 1995; FUMUSO et al., 2003; FUMUSO et al., 2006; FUMUSO et al., 2007; WOODWARD et al., 2013; CHRISTOFFERSEN et al., 2017). Além disso, fêmeas suscetíveis podem apresentar dificuldade na limpeza física uterina e drenagem insuficiente devido a alteração no padrão da atividade contrátil da musculatura lisa do útero (TROEDSSON & LIU, 1991; LE BLANC et al., 1994; RIGBY et al., 2001; FIORATTI, 2010).

A menor fertilidade observada em jumentas ao serem inseminadas com sêmen asinino criopreservado pode estar relacionada a uma exacerbação da resposta inflamatória aguda após a IA, como observado em éguas com EPPC (CHAPERO et al., 2023). COSTA et al. (2023) demonstraram que a resposta inflamatória uterina apresenta maior porcentagem de células inflamatórias com resolução mais tardia após IA com sêmen asinino criopreservado, em comparação a éguas inseminadas com o mesmo sêmen. Vale ressaltar também que a espécie asinina apresenta peculiaridades anatômicas e fisiológicas que a diferem da espécie equina, como maior inclinação do vestíbulo vaginal, vulva abaixo do assoalho pélvico, cérvix

relativamente mais longa e tortuosa e menor drenagem uterina, que podem facilitar a persistência da endometrite (VENDRAMINI et al., 1998; SOKKAR et al., 2001; RENNER-MARTIN et al., 2009; CANISSO et al., 2019). No entanto, ainda são escassos os estudos sobre endometrite pós cobertura em jumentas e sua relação com os índices de fertilidade insatisfatórios.

Quanto ao diagnóstico desta condição, a presença de líquido intrauterino (LIU) no estro e sua permanência por mais de 24 horas após IA, é um preditor de suscetibilidade à endometrite em éguas (WATSON, 2000a; BARBACINI et al., 2003; BRINSKO et al., 2003), podendo ser avaliado por ultrassonografia modo B. A ultrassonografia modo Doppler também pode ser valiosa por fornecer informações sobre os aspectos hemodinâmicos dos vasos e a arquitetura vascular de diversos órgãos (BOLLWEIN et al., 1998; GITHER, 2004; CARVALHO et al., 2008). PEREIRA et al. (2014) observaram que a US Modo Doppler foi capaz de confirmar a presença da inflamação aguda pela observação do aumento de vascularização uterina, sendo útil para o diagnóstico complementar da endometrite bacteriana em éguas.

Um grande número de PMNs no útero inseminado também fornece importante indicador de endometrite aguda. Para isso, o exame de esfregaço citológico endometrial é frequentemente utilizado para um diagnóstico mais rápido e fácil, principalmente em condições a campo, obtendo-se o tipo e a proporção das células inflamatórias em relação às células endometriais (BROOK et al., 1993; KATILA, 2016; COCCHIA et al., 2012; QUARTUCCIO et al., 2020). As amostras de citologia endometrial podem ser obtidas através de um swab, escova citológica ou lavado uterino de baixo volume, mas as lâminas adquiridas com escova citológica apresentam mais células quando comparadas às realizadas com swab contendo ponta de algodão (CANISSO et al., 2020). No entanto, apenas um pequeno segmento do útero é amostrado e, portanto, infecções focais podem passar despercebida. Assim, uma avaliação histológica a partir da biópsia uterina oferece um diagnóstico mais confiável, indicando presença de inflamação aguda e crônica e fibrose endometrial (KENEY & DOIG, 1986; SCHLAFER, 2007; SNIDER et al., 2011; KATILA, 2016).

3. Terapias para Endometrite persistente pós-cobertura (EPPC)

Quando o embrião chega ao útero, por volta do 5º ao 6º dia após a fertilização, este deve encontrar um ambiente propício para o seu desenvolvimento (PRESTES & LADIM-ALVARENGA, 2017). Portanto, diferentes tratamentos têm sido estudados visando controlar a resposta inflamatória uterina nas primeiras 96 horas, para aumentar as chances de

sobrevivência do embrião (KATILA, 2001; HURTTGEN, 2006; LEBLANC et al., 2010). Tais tratamentos buscam modular ou mesmo suprimir a resposta imune, como forma de reduzir a inflamação uterina pós-inseminação/cobertura. O tratamento tradicional faz o uso da combinação de diversas terapias, como lavagem uterina, agentes ecbólicos, anti-inflamatórios e antibióticos, caso necessário. Por não atuar diretamente no processo inflamatório e apenas minimizar os fatores relacionados à sua instalação, as terapias tradicionais são consideradas de suporte (LEBLANC et al., 2010; CANISSO et al., 2016). Outros tratamentos alternativos também estão sendo desenvolvidos, como por exemplo acupuntura, terapia com ozônio e plasma rico em plaquetas, podendo estar associados ou não às terapias tradicionais (SCHOFIEL, 2008; SCOGGIN, 2016; SWIFT et al., 2020; ALMEIDA et al., 2021; SEGABINAZZI et al., 2021). Uma grande variedade de protocolos de tratamento tem sido utilizada atualmente, visando principalmente controlar a EPPC em éguas suscetíveis, mas nenhum tratamento único foi amplamente aceito como eficaz (BUCCA et al., 2008).

A limpeza física do endométrio pode ser realizada através da lavagem uterina e da administração de agentes ecbólicos, que promovem contratilidade miométrial e drenagem linfática como estratégia para prevenir a EPPC (ALLEN, 1991; LEBLANC et al., 1994; COMBS et al., 1996; RASCH et al., 1996). Após a cobertura ou IA, uma concentração mínima adequada de espermatozoides consegue alcançar a tuba uterina em até 4 horas (FIALA et al., 2007). Assim, terapias intrauterinas têm sido utilizadas logo após esse período de tempo, com o intuito de remover mecanicamente detritos inflamatórios e/ou microrganismos, sem afetar o transporte espermático.

O uso de anti-inflamatórios é amplamente utilizado na reprodução equina e ainda são objeto de diversos estudos na tentativa de modular a resposta inflamatória pós-reprodução em éguas e jumentas. A modulação iatrogênica com tratamento com glicocorticoides ou anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) pode ser indicada em fêmeas suscetíveis para prevenir inflamação excessiva. Os glicocorticoides alteram a expressão de genes envolvidos no sistema complemento, citocinas, TNF, fator de crescimento transformador (TGF) e complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (WOLF et al., 2012), o que reduz a inflamação e explica a melhoria da fertilidade observada após o tratamento com glicocorticoides, como dexametasona (BUCCA et al., 2008) ou prednisolona (DELL'AQUA et al., 2006) em éguas suscetíveis. Em contrapartida, VANDAELE et al. (2010) observaram que o tratamento com dexametasona em dose única após a inseminação não afetou as taxas de prenhez em éguas. Além disso, enquanto alguns estudos relataram redução do líquido intrauterino (BUCCA et al., 2008; STOUT et al., 2012), outros estudos não observaram melhora deste parâmetro (FIORATTI et al., 2010). Em

jumentas, CHAPERO et al. (2023) avaliaram o efeito da dexametasona nas respostas inflamatórias endometriais após IA com sêmen de jumento congelado, porém uma dose única de dexametasona no momento da IA não diminuiu os PMN endometriais, mas diminuiu os eosinófilos 24 horas após a inseminação.

Já os AINEs atuam na inativação das enzimas que degradam o ácido araquidônico, este que é liberado após alguma lesão de membrana celular, sendo essas enzimas denominadas de Ciclooxigenase (COX) e a Lipoxigenase (LOX) (WOLF et al., 2012). Foram observados efeitos benéficos do tratamento com vedaprofeno (ROJER & AURICH, 2010) ou firocoxibe (FRISO et al., 2019) antes da reprodução e também de outros anti-inflamatórios (meclofenâmico ou flunixinina meglumina) na resposta inflamatória do endométrio de éguas receptoras de embrião, na fase lútea após a transferência do embrião. RISCO et al. (2008) relataram que o tratamento com flunixinina meglumina reduz o número de PMNs 8 horas após a inseminação em éguas suscetíveis à EPPC. Em jumentas, VILES et al. (2013a) não identificaram redução de PMNs após o tratamento com cetoprofeno em jumentas 24 horas antes da IA com sêmen asinino congelado e durante os 4 dias seguintes, mas observaram redução na expressão de COX-2 nesse grupo.

4. Plasma Rico em Plaquetas (PRP)

O Plasma Rico em Plaquetas é um composto derivado do sangue total que apresenta alta concentração plaquetária, possuindo efeito terapêutico imunomodulador, analgésico, anti-inflamatório, mitogênico e neovascular, que estimula o processo de cicatrização e a capacidade regenerativa de tecidos (MARX, 2001; ANITUA et al., 2004; MARX, 2004; ALVES & GRIMALT, 2017).

As plaquetas são fragmentos subcelulares formados a partir de megacariócitos e presentes em altas concentrações no sangue. Esses fragmentos configuram-se como corpúsculos anucleados, discoides quando inativos e pseudópodes quando ativos (HARTWIG & ITALIANO, 2003; FOSTER et al., 2009; BOUDREAUX, 2010), e que possuem três tipos de grânulos em sua estrutura:

- Grânulos alfas são os mais abundantes e contêm moléculas bioativas como proteínas adesivas, fatores de coagulação, fatores fibrinolíticos, integrinas, molécula de adesão celular endotelial de plaquetas (PECAM) e os fatores de crescimento, sendo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) os mais predominantes. Os fatores de crescimento apresentam diversos efeitos

biológicos, incluindo modulação da inflamação e aumento da capacidade regenerativa dos tecidos (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001; BLAIR & FLAUMENHAFT, 2009)

- Grânulos delta (densos) contêm principalmente moléculas que estimulam o processo de coagulação, incluindo o cálcio, adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) e serotonina (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).
- Grânulos lambda são os lisossomos que contêm uma variedade de enzimas digestivas, como glicosidases, proteases e proteínas catiônicas (RENDU & BROHARD-BOHN, 2001).

Na medicina veterinária, o PRP tem sido muito utilizado no auxílio ao tratamento de lesões musculoesqueléticas, como osteoartrites, desmites, fraturas, tendinopatias, e lesões cutâneas (CARMONA et al., 2007; ARGÜELLES et al., 2008; KIM et al., 2009; MAIA, 2009; BOSCH et al., 2011; SILVA et al., 2013; PEREIRA et al., 2019; MONTANO et al., 2021). Na reprodução equina, estudos mostraram que a infusão intrauterina com PRP mitiga a resposta inflamatória, através da redução de PMNs (REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al, 2017; SEGABINAZZI et al, 2021; ANDINO et al., 2023) e de líquido intrauterino pós-reprodução (METCALF, 2014; REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al, 2021), melhorando assim as taxas de fertilidade (METCALF, 2014; SEGABINAZZI et al., 2017). Mais recentemente, SEGABINAZZI et al. (2021) observaram também uma função antibacteriana do PRP em equinos, devido à redução do número de culturas bacterianas positivas em comparação com ciclos atribuídos ao controle. A terapia intrauterina com PRP também aumentou a porcentagem de embriões recuperados por lavagem e por número de ovulações. METCALF et al. (2012) e SEGABINAZZI et al. (2017) demonstrado que o PRP regula negativamente os transcritos endometriais para as interleucinas IL-1 β , IL-6 e CXCL-8 e, conseqüentemente, mitiga a resposta inflamatória pós-reprodução.

Em jumentas, FARGHALI et al. (2022) relataram que duas infusões intrauterinas de PRP autólogo, realizadas na fase de diestro e com intervalo de 7 dias entre elas, restauraram a aparência normal do endométrio e reduziram o processo inflamatório em fêmeas que apresentavam endometrite infecciosa aguda. Neste mesmo estudo, após o tratamento com PRP, observou-se diminuição significativa de células inflamatórias, de líquido luminal, da espessura e da perfusão vascular do útero, além de mostrar redução de isolados bacterianos uterinos e de biomarcadores de estresse oxidativo no soro e no fluido uterino. De forma similar, FANTINI et al. (2021) obtiveram sucesso no tratamento de duas jumentas diagnosticadas com endometrite

crônica (classificadas como 2B na classificação histológica endometrial de Kenney e Doig de 1986) e inférteis nos últimos dois anos, empregando uma única infusão intrauterina de 20 mL de PRP, o que resultou em diagnósticos positivos de gestação no ciclo estral subsequente dessas fêmeas.

A preparação manual é o método clássico de obtenção do PRP que consiste na concentração de plaquetas do sangue total, por meio de uma ou mais centrifugações, resultando na obtenção de uma fração do plasma sanguíneo com maior número de plaquetas (DOHAN EHRENFEST et al., 2009; ARNOCZKY et al., 2011; DHURAT et al., 2014). Apesar da facilidade de aplicabilidade e baixo custo desse tipo de processamento, existe a necessidade de preparo imediato para utilização do PRP e da repetição de aplicações, a depender do tratamento. Recomenda-se o uso imediato do PRP após o seu processamento, pois os fatores de crescimento são ativamente secretados dos grânulos alfa durante os primeiros 10 minutos após ocorrer a ativação plaquetária e mais de 95% de fatores pré-sintetizados são liberados na primeira hora (MARX, 2004).

A obtenção do PRP acontece através de uma amostra de sangue venoso do paciente coletado com anticoagulante para evitar a ativação plaquetária precoce (MARX, 2001). MIRANDA et al. (2018) compararam dois anticoagulantes, citrato de sódio a 3,2% e ácido cítrico citrato de sódio e dextrose (ACD), para obtenção do PRP em equinos e muare e relataram que o tipo de anticoagulante não afetou significativamente a concentração plaquetária. No entanto, o citrato de sódio foi mais eficiente na redução de leucócitos em ambas as espécies. GIRALDO et al. (2015) demonstraram que o tipo de anticoagulante (citrato de sódio ou solução de ACD) não afetou significativamente a contagem de plaquetas e leucócitos e em alguns parâmetros associados à ativação plaquetária. O sangue então é submetido a uma centrifugação para separar as células vermelhas e brancas das plaquetas, devido suas diferentes densidades. Uma segunda centrifugação também pode ser realizada para concentrar as plaquetas, produzindo o plasma rico em plaquetas (PRP) e o plasma pobre em plaquetas (PPP) (FOSTER et al., 2009; DOHAN EHRENFEST et al., 2009; ARNOCZKY et al., 2011). Quando o plasma é exposto à trombina (seja pela adição de trombina exógena ou pelo contato com a tromboplastina tecidual, também conhecida como fator tecidual), a cascata de coagulação é iniciada e as plaquetas são ativadas (MANN, 1999), sendo necessário pelo menos 300.000 plaquetas/ μ L para se obter efeitos terapêuticos (ANITUA et al., 2004).

Atualmente existem diversos protocolos para preparação do PRP, variando quanto à força, tempo e número de centrifugações, tipo e concentração de anticoagulante, redução do volume plasmático, concentração plaquetária obtida e presença ou ausência de glóbulos

vermelhos e/ou brancos em sua composição. Assim, os resultados obtidos podem não só variar entre técnicas, mas também dentro da mesma técnica, o que faz com que determinado efeito não pode ser aplicado universalmente a todas as preparações de PRP, gerando resultados clínicos conflitantes (ARNOCZKY et al., 2011; DELONG et al., 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012; DHURAT et al., 2014).

Em equinos, CARMONA et al. (2007) testou um protocolo com duas centrifugações para produção do PRP para tratamento da osteoartrite. Nesse estudo, o sangue coletado foi centrifugado a $120\times g$ por 5 minutos e, posteriormente, 50% da fração inferior plasmática foi novamente centrifugada a $240\times g$ por 5 minutos. O PRP foi considerado como 25% da segunda fração, obtendo média de 250.000 ± 7.180 plaquetas/ μL . SEGABINAZZI et al. (2017) utilizaram o método de centrifugação única ($120 \times g$ por 10 minutos) obtendo concentração plaquetária média de $354.236 \pm 17.540/\mu L$, enquanto SEGABINAZZI et al. (2021) optaram por duas centrifugações, sendo a primeira a $400\times g$ por 15 minutos e a segunda a $1000\times g$ por 10 minutos, apresentando média de 622.900 ± 144 plaquetas/ μL . Diferentes anticoagulantes também foram utilizados na preparação do PRP, principalmente 3,2% de citrato de sódio (CARMONA et al., 2007; REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2017), 3,8% de citrato de sódio (ARGÜELLES et al., 2006; MAIA et al., 2009) e citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA) (PEREIRA et al., 2019; SEGABINAZZI et al., 2021; COLOMBO et al., 2022).

Em jumentas, FARGHALI et al. (2022) prepararam o PRP a partir da coleta de sangue em solução de citrato de sódio a 3,8%, seguida de uma centrifugação suave ($250\times g$ /10 min) seguida da separação do plasma com uma centrifugação forte ($2000\times g$ /10 min), de acordo protocolo anterior utilizado em cães (FARGHALI et al., 2017; FARGHALI et al., 2019). Neste estudo, utilizou-se concentração plaquetária mínima de $2.000.000/\mu L$. XUE et al. (2023) compararam dois protocolos, um método de centrifugação única ($120\times g$ por 10 minutos) e outro método com duas centrifugações, sendo a primeira a $400\times g$ por 15 minutos e a segunda a $1000\times g$ por 10 minutos e relataram que os dois protocolos são aplicáveis para produção do PRP na espécie asinina, mas que a centrifugação dupla produziu maior concentração de plaquetas, apesar da maior contaminação de leucócitos e hemácias do que o método de centrifugação única. FANTINI et al. (2021) testaram o processo de centrifugação única a $133\times g$ por dois tempos de centrifugação diferentes (10 e 15 min) para produção do PRP em jumentas, usando citrato dextrose ácido (ACD) como anticoagulante, e apresentaram concentração plaquetária de 406.500 ± 27.290 e 479.500 ± 75.050 por μL , respectivamente.

Desta forma, não há uma padronização das técnicas de preparo, gerando resultados variáveis, falta de consenso do efeito terapêutico e limitação na comparação entre os mesmos.

Utilizar a técnica de produção do PRP autólogo, usando o próprio sangue do paciente, promove maior segurança na sua utilização, evitando riscos de transmissão de doenças e rejeição, porém reforça a variabilidade de resultados. Além disso, a escassez de estudos que compreendem o uso terapêutico do PRP, principalmente na espécie asinina, e a utilização de técnicas baseando-se em outras espécies pode interferir em seu êxito.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O presente estudo propõe comparar sete protocolos manuais de preparação do PRP na espécie asinina e avaliar o efeito da infusão intrauterina de PRP, antes e antes e após inseminação artificial, na resposta inflamatória uterina e na taxa de fertilidade de fêmeas asininas inseminadas com sêmen asinino criopreservado.

2. Objetivos específicos

Comparar a concentração de plaquetas, hemácias, leucócitos e aglomerados plaquetários de sete protocolos manuais para a obtenção do PRP na espécie asinina;

Avaliar o efeito do uso do PRP intrauterino na presença de líquido intrauterino, edema endometrial, vascularização, migração de células polimorfonucleadas, fibrose e quantificação de colágeno após a inseminação artificial de jumentas;

Verificar o momento ideal da aplicação do PRP no útero, para modulação da resposta inflamatória uterina após inseminação artificial com sêmen criopreservado em jumentas;

Avaliar o efeito do PRP sobre a taxa de fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen criopreservado de asinino.

HIPÓTESES

Nossa principal hipótese é que o tratamento local utilizando PRP reduz a resposta inflamatória uterina e aumenta a taxa de fertilidade de fêmeas asininas inseminadas com sêmen asinino criopreservado. Além disso, o tratamento com duas infusões de PRP (antes e após a IA) é mais eficaz do que apenas uma infusão antes da IA.

Os protocolos testados para obtenção do PRP apresentarão diferenças na concentração de plaquetas, na contaminação por leucócitos e hemácias, como também na formação de agregados plaquetários.

REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI, A. S.; MADILL, S.; FOSTER, D. N. Seminal plasma improves fertility of frozen equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 242-245, 2005.
- ALLEN, W. E. Investigations into the use of exogenous oxytocin for promoting uterine drainage in mares susceptible to endometritis. **Veterinary Record**, v. 128, n. 25, p. 593-594, 1991.
- ALMEIDA, B. F. M.; AMATTI, L. Z.; SOUZA, G. G.; GARCIA, L. V.; MONTECHIESI, D. F.; IGNÁCIO, F. S. et al. Effect of uterine ozone therapy and anticoagulant sampling on oxidative stress parameters in mares. **Research in Veterinary Science**, v. 136, p. 503-511, 2021.
- ALVES, R.; GRIMALT, R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. **Skin Appendage Disorders**, v. 4, n. 1, p. 18-24, 2017.
- ANDINO, A. P.; CUMBUSIS, A. M.; AFFONSO, F. J.; SERRANO-RECALDE, E. C. Mitigation of post breeding endometritis in mares treated with platelet rich plasma. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104688, 2023.
- ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 91, n. 1, p. 4-15, 2004.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; PASTOR, J.; IBORRA, A.; VIÑALS, L.; MARTÍNEZ, P.; BACH, E.; PRADES, M. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 2, p. 237-245, 2006.
- ARGÜELLES, D.; CARMONA, J. U.; CLIMENT, F.; MUÑOZ, E.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. **Veterinary Record**, v. 162, n. 7, p. 208-211, 2008.
- ARNOCZKY, S. P.; DELOS, D.; RODEO, S. A. What is platelet-rich plasma?. **Operative Techniques in Sports Medicine**, v. 19, n. 3, p. 142-148, 2011.
- ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas de motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. Tese (Livre Docência em Reprodução Animal) - Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, SP, 2000.
- AVANZI, B. R.; DOS SANTOS RAMOS, R.; ARAUJO, G. H. M.; FIORATTI, E. G.; TRINCA, L. A.; et al. Fixed-time insemination with frozen semen in mares: is it suitable for poorly fertile stallions?. **Theriogenology**, v. 83, n. 9, p. 1389-1393, 2015.
- BACH, M. K.; BRASHLER, J. R.; STOUT, B. K.; JOHNSON, H. G.; SANDERS, M. E.; LIN, A. H.; et al. Activation of human eosinophils by platelet-derived growth factor. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 97, n. 2, p. 121-129, 1992.

BARBACINI, S.; NECCHI, D.; ZAVAGLIA, G.; SQUIRES, E. L. Retrospective study on the incidence of post insemination uterine fluid in mares inseminated with frozen/thawed semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 23, n. 11, p. 493-496, 2003.

BEDFORD, S. J.; JASKO, D. J.; GRAHAM, J. K.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, n. 5, p. 955-967, 1995.

BLAIR, P.; FLAUMENHAFT, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. **Blood Reviews**, v. 23, n. 4, p. 177-189, 2009.

BOLLWEIN, H.; MAIERL, J.; MAYER, R.; STOLLA, R. Transrectal color Doppler sonography of the A. uterina in cyclic mares. **Theriogenology**, v. 49, n. 8, p. 1483-1488, 1998.

BOSCH, G.; MOLEMAN, M.; BARNEVELD, A.; VAN WEEREN, P. R.; VAN SCHIE, H. T. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 21, p. 554-561, 2011.

BOUDREAUX, M. K. **Platelet structure**. In: WEISS, T. J.; WARDROP, K. J. (Eds.). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th ed. Ames: Blackwell, 2010. p. 561-568.

BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L.; VARNER, D.; BLANCHARD, T. L. **A practical method for recognizing mares susceptible to post-breeding endometritis**. In: AAEP Proceedings, 2003. p. 363-365.

BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; HINRICHS, K.; et al. **Manual of Equine Reproduction**. 3rd ed. St. Louis: C.V. Mosby, 2011. 336 p.

BROOK, D. **Uterine cytology**. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.). *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 246-253.

BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, G.; FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, n. 7, p. 1093-1100, 2008.

BURDEN, F.; THIEMANN, A. Donkeys are different. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, n. 5, p. 376-382, 2015.

CAMILLO, F.; PANZANI, D.; SCOLLO, C.; ROTA, A.; CRISCI, A.; VANNOZZI, I.; et al. Embryo recovery rate and recipients' pregnancy rate after nonsurgical embryo transfer in donkeys. **Theriogenology**, v. 73, n. 7, p. 959-965, 2010.

CANISSO, I. F.; CARVALHO, G. R.; MOREL, M. D.; KER, P. G.; RODRIGUES, A. L.; SILVA, E. C.; et al. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 42, n. 2, p. 179-183, 2011.

CANISSO, I. F.; STEWART, J.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Endometritis: Managing Persistent Post-Breeding Endometritis. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 465-480, 2016.

CANISSO, I. F.; PANZANI, D.; MIRÓ, J.; ELLERBROCK, R. E. Key aspects of donkey and mule reproduction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 35, n. 3, p. 607-642, 2019.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, E. Persistent breeding-induced endometritis in mares—a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 1432, 2020.

CARMONA, J. U.; ARGUELLES, D.; CLIMENT, F.; PRADES, M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 17, p. 167-170, 2007.

CARNEIRO, G. F.; LUCENA, J. E. C.; BARROS, L. O. The current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 106-110, 2018.

CARVALHO, C. F.; CHAMMAS, M. C.; CERRI, G. G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 872-879, 2008.

CAZALES, N.; FIALA-RECHSTEINER, S. M.; CAVESTANY, D.; MATTOS, R. C. Insemination dose and site with frozen semen affects the sperm transport and inflammatory response in mares? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 66, p. 109-110, 2018.

CHAPERO, L.; ROSSETTO, L.; SÁNCHEZ, J.; BILBAO, M. G.; LOSINNO, L. Dexamethasone's effect on endometrial inflammatory response in jennies after artificial insemination with frozen donkey semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, 104701, 2023.

CHERRY, W. B.; YOON, J.; BARTEMES, K. R.; IJIMA, K.; KITA, H. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 6, p. 1484-1490, 2008.

CHRISTOFFERSEN, M.; TROEDSSON, M. H. T. Inflammation and fertility in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 14-20, 2017.

CINTRA, A. G. C. **O Cavalo: Características, Manejo e Alimentação**. 1.ed. Roca, 2011. 384p.

COCCHIA, N.; PACIELLO, O.; AULETTA, L.; UCCELLO, V.; SILVESTRO, L.; MALLARDO, K.; et al. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 89-98, 2012.

COLLINS, T.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Robbins Pathologic Basic of Disease**, 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999.

COLOMBO, I.; MISLEI, B.; MARI, G.; IACONO, E.; MERLO, B. Effect of platelet lysate on uterine response of mares susceptible to persistent mating-induced endometritis. **Theriogenology**, v. 179, p. 204-210, 2022.

COMBS, G. B.; LEBLANC, M. M.; NEUWIRTH, L.; TRAN, T. Q. Effects of prostaglandin F2 α , cloprostenol and fenprostalene on uterine clearance of radiocolloid in the mare. **Theriogenology**, v. 45, p. 1449-1455, 1996.

COSTA, L. M. L. **Avaliação da resposta inflamatória uterina em jumentas e éguas inseminadas com sêmen criopreservado de asininos**. 2022. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2022.

COSTA, L. M. L.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; ALBINO, M. V.; FONTES, C. S.; TEIXEIRA, C. S.; FREITAS, M. S.; et al. Does the uterine inflammatory response differ between mares and donkey jennies inseminated with frozen donkey semen? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, 104703, 2023.

DELL'AQUA, J. A. Jr.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MACEDO, L. P.; MELO, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 270-273, 2006.

DELONG, J. M.; RUSSELL, R. P.; MAZZOCCA, A. D. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. **Arthroscopy**, v. 28, n. 7, p. 998-1009, 2012.

DHURAT, R.; SUKESH, M. S. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. **Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery**, v. 7, n. 4, p. 189-197, 2014.

DIAZ-JIMENEZ, M.; ROTA, A.; DORADO, J.; CONSUEGRA, C.; PEREIRA, B.; CAMILLO, F.; et al. First pregnancies in jennies with vitrified donkey semen using a new warming method. **Animal**, v. 15, n. 1, 100097, 2021.

DORÉ, M.; SIROIS, J. Regulation of P-selectin expression by inflammatory mediators in canine jugular endothelial cells. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 6, p. 662-671, 1996.

EISENBACH, M. Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract?. **Medical Hypotheses**, v. 60, n. 4, p. 590-592, 2003.

EHRENFEST, D. M. D.; RASMUSSEN, L.; ALBREKTSSON, T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 158-167, 2009.

ESNAULT, S.; KELLY, E. A. Essential mechanisms of differential activation of eosinophils by IL-3 compared to GM-CSF and IL-5. **Critical Reviews in Immunology**, v. 36, n. 5, 2016.

FANTINI, P.; JIMÉNEZ, R.; VILÉS, K.; IBORRA, A.; PALHARES, M. S.; et al. Simple Tube Centrifugation Method for Platelet-Rich Plasma (PRP) Preparation in Catalonian Donkeys as a Treatment of Endometritis-Endometrosis. **Animals**, v. 11, n. 10, 2918, 2021.

FARGHALI, H. A.; ABDELKADER, N. A.; KHATTAB, M. S.; ABUBAKR, H. O. Evaluation of subcutaneous infiltration of autologous platelet-rich plasma on skin-wound healing in dogs. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 2, 2017.

FARGHALI, H. A.; ABDELKADER, N. A.; ABUBAKR, H. O.; ALJUAYDI, S. H.; KHATTAB, M. S.; ELHELW, R.; ELHARIRI, M. Antimicrobial action of autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 12722, 2019.

FARGHALI, H. A.; ABDELKADER, N. A.; FATHI, M.; EMAM, I. A.; ABUBAKR, H. O.; ALJUAYDI, S. H.; et al. The efficiency of intrauterine infusion of platelet-rich plasma in the treatment of acute endometritis as assessed by endoscopic, Doppler, oxidative, immunohistochemical, and gene expression alterations in jennies. **Theriogenology**, v. 181, p. 147-160, 2022.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of skim milk and seminal plasma uterine infusions in mares. **Theriogenology**, v. 58, n. 2/4, p. 491–494, 2002.

FIALA, S. M.; PIMENTEL, C. A.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. **Theriogenology**, v. 67, p. 556-562, 2007.

FIORATTI, E. G.; VILLAVERDE, A. I. S. B.; AVANZI, B. R.; LEAL, A. C. M. S.; CALDAS-BUSSIÈRE, M. C.; ALVARENGA, M. A. Nitric oxide concentration in free uterine fluid after dexamethasone treatment of mares resistant and susceptible to endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 121, p. 113-114, 2010.

FLORES, E.; TABERNER, E.; RIVERA, M. M.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J.; et al. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. **Theriogenology**, v. 70, n. 6, p. 936-945, 2008.

FOLCH, P.; JORDANA, J. Characterization, reference ranges and the influence of gender on morphological parameters of the endangered Catalanian donkey breed. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 17, n. 2, p. 102-111, 1997.

FOSTER, T. E.; PUSKAS, B. L.; MANDELBAUM, B. R.; GERHARDT, M. B.; RODEO, S. A. Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. **American Journal of Sports Medicine**, v. 37, n. 11, p. 2259-2272, 2009.

FRISO, A. M.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; CYRINO, M.; CORREAL, S. B.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; CARMO, M. T.; et al. Perioovulatory administration of firocoxib did not alter ovulation rates and mitigated post-breeding inflammatory response in mares. **Theriogenology**, v. 138, p. 24-30, 2019.

FUMUSO, E.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; DAVID, O.; WADE, J.; ROGAN, D. Interleukin-8 (IL-8) and 10 (IL-10) mRNA transcriptions in the endometrium of normal mares and mares susceptible to persistent post-breeding endometritis. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 282-285, 2006.

- FUMUSO, E. A.; AGUILAR, J.; GIGUÈRE, S.; RIVULGO, M.; WADE, J.; ROGAN, D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: effects of immunomodulation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 1-2, p. 30-39, 2007.
- GEERING, B.; STOECKLE, C.; CONUS, S.; SIMON, H. U. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 8, p. 398-409, 2013.
- GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, n. 12, p. 516-526, 2004.
- GIRALDO, C. E.; ÁLVAREZ, M. E.; CARMONA, J. U. Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2015.
- GRAHAM, J. K. **Principles of cooled semen**. In: MCKINNON, A. O.; et al. Equine Reproduction. 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2011. p. 1308-1315.
- GUILLIAMS, M.; MILDNER, A.; YONA, S. Developmental and functional heterogeneity of monocytes. **Immunity**, v. 49, n. 4, p. 595-613, 2018.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.
- HARTWIG, J.; ITALIANO, J. The birth of the platelet. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1, n. 7, p. 1580-1586, 2003.
- HOGAN, S. P.; ROSENBERG, H. F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S.; FOSTER, P. S.; LACY, P.; et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, n. 5, p. 709-750, 2008.
- HORIE, S.; OKUBO, Y.; HOSSAIN, M.; SATO, E.; NOMURA, H.; KOYAMA, S.; et al. Interleukin-13 but not interleukin-4 prolongs eosinophil survival and induces eosinophil chemotaxis. **Internal Medicine**, v. 36, n. 3, p. 179-185, 1997.
- HURTGEN, J. P. Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: a review. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 560-566, 2006.
- KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI, A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 1, p. 25-29, 2003.
- KATILA, T. Onset and Duration of Uterine Inflammatory Response of Mares after Insemination with Fresh Semen. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. 1, p. 515-517, 1995.
- KATILA, T. Uterine defence mechanisms in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 197-204, 1996.
- KATILA, T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 42, n. 2, p. 1-17, 2001.

- KATILA, T. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 5, p. 31-41, 2012.
- KATILA, T. Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reproduction in Biology*, v. 16, n. 3, p. 189-196, 2016.
- KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. **Equine endometrial biopsy**. In: MORROW, D. A. (Ed.). *Current Therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders Company, 1986. p. 726-729.
- KIM, J. H.; PARK, C.; PARK, H. M. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 2, p. 123-126, 2009.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v. 13, p. 159-175, 2013.
- KOTILAINEN, T.; HUHTINEN, M.; KATILA, T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, v. 41, n. 3, p. 629-636, 1994.
- KUGLER, W.; GRUNENFELDER, H. P.; BROXHAM, E. **Donkey breeds in Europe**. Monitoring Institute for Rare Breeds and Seeds in Europe, St. Gallen, Switzerland, 2008.
- LEBLANC, M.; NEUWIRTH, D.; MAURAGIS, E.; KLAPSTEIN.; T. TRAN. Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. *Equine Veterinary Journal*, v. 26, n. 4, p. 279-282, 1994.
- LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, suppl. 3, p. 10-22, 2009.
- LEBLANC, M. M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p. 21-27, 2010.
- LEHMAN, H. K.; SEGAL, B. H. The role of neutrophils in host defense and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 145, n. 6, p. 1535-1544, 2020.
- LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. *Theriogenology*, v. 70, n. 3, p. 415-420, 2008.
- LOOMIS, P. R. The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction Science*, v. 68, n. 3-4, p. 191-200, 2001.
- MAIA, L.; SOUZA, M. V. de; JÚNIOR, J. I. R.; OLIVEIRA, A. C.; ALVES, G. E. S.; et al. Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Induced Tendinopathy in Horses: Histologic Evaluation. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 29, n. 8, p. 618-626, 2009.
- MAISCHBERGER, E.; IRWIN, J. A.; CARRINGTON, S. D.; DUGGAN, V. E. Equine post-breeding endometritis: A review. *Irish Veterinary Journal*, v. 61, p. 1-6, 2008.
- MALSCHITZKY, E.; JOBIN, M. I. M. M.; MATTOS, R. C.; GREGORY, R. M. Endometrite na égua, novos conceitos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, n. 1, p. 17-26, 2007.

MANN, K. G. Biochemistry and physiology of blood coagulation. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 82, n. 8, p. 165-174, 1999.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP). What is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v. 10, n. 4, p. 225-228, 2001.

MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 62, p. 489-496, 2004.

MELO, R. C.; WELLER, P. F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 10, p. 1341, 2010.

METCALF, E. S.; SCOGGIN, K.; TROEDSSON, M. H. T. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition (Abstract). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 498, 2012.

METCALF, E. S. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis (PMIE). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 128, 2014

MIRANDA, A. L. S.; SOTO-BLANCO, B.; LOPES, P. R.; VICTOR, R. M.; et al. Influence of anticoagulants on platelet and leukocyte concentration from platelet-rich plasma derived from blood of horses and mules. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 63, p. 46-50, 2018.

MIRÓ, J.; PAPAS, M. Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control in Donkeys. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 65, p. 38-43, 2018.

MIRÓ, J.; MARÍN, H.; CATALÁN, J.; PAPAS, M.; GACEM, S.; YESTE, M. Seminal Plasma, Sperm Concentration, and Sperm-PMN Interaction in the Donkey: An In Vitro Model to Study Endometrial Inflammation at Post-Insemination. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 3478, 2020.

MONTANO, C.; AULETTA, L.; GRECO, A.; COSTANZA, D.; COLUCCIA, P.; DEL PRETE, C. et al. The use of platelet-rich plasma for treatment of tenodesmic lesions in horses: a systematic review and meta-analysis of clinical and experimental data. **Animals**, vol. 11, n. 3, p. 793, 2021.

MORELL, M. C. **Equine Reproductive Physiology, Breeding and Stud Management**. 2nd ed. CAB, 2008. 384 p.

MORRIS, L. H. A.; MCCUE, P. M.; AURICH, C. Equine endometritis: A review of challenges and new approaches. **Reproduction**, vol. 160, n. 5, p. R95-R110, 2020.

NASH, T. Chemical constitution and physical properties of compounds able to protect living cells against damage due to freezing and thawing. **Cryobiology**, v. 46, p. 179-211, 1966.

NEELY, D. P.; KINDAHL, H.; STABENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. E.; HUGHES, J. P. Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 27, p. 181-189, 1979.

NOGA, O.; ENGLMANN, C.; HANF, G.; GRÜTZKAU, A.; GUHL, S.; KUNKEL, G. Activation of the specific neurotrophin receptors TrkA, TrkB and TrkC influences the function of eosinophils. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 32, n. 9, p. 1348-1354, 2002.

OLIVEIRA, J. V.; ALVARENGA, M. A.; MELO, C. M.; MACEDO, L. M.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 82-84, 2006.

OLIVEIRA, J. V.; PAPA, F. O.; MELO-OÑA, C. M.; MONTEIRO, G. A.; PUOLI-FILHO, J. N.; ALVARENGA, M. A. New procedures to freeze donkey semen and its influence on mares and jennies fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 8, n. 32, p. 503-504, 2012.

OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, P. V. L. F.; OÑA, C. M. M.; GUAISTI, P. N.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; et al. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1267-1273, 2016.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. **Anti-inflammatory cytokines**. *Chest*, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.

ORTIZ, I.; DORADO, J.; ACHA, D.; GALVEZ, M. J.; URBANO, M.; HIDALGO, M. Colloid single-layer centrifugation improves post-thaw donkey (*Equus asinus*) sperm quality and is related to ejaculate freezability. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p. 332-340, 2015.

PACE, M. M.; SULLIVAN, J. J. Effect of timing of insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, 1975, p. 115-121.

PALM, F.; WALTER, I.; BUDIK, S.; KOLODZIEJEK, J.; NOWOTNY, N.; AURICH, C. Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1beta, IL-6, TNF-alpha and COX-2 mRNA in the equine endometrium. **Theriogenology**, v. 70, p. 843-851, 2008.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: Proceedings 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, vol. 3, Urbana (Abstract 377), 1984.

PANZANI, D.; ROTA, A.; CRISCI, A.; CAMILLO, F. Embryo recovery rate and uterine response in mares artificially inseminated with frozen-thawed semen extended or not with stallion seminal plasma. In: Proceedings 63rd SISVET Congress, Udine, 2009, p. 76-78.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; FIORATTI, E. G.; DELLA'QUA JUNIOR, J. A.; ZAHN, F. S.; ALVARENGA, M. A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 293-301, 2008.

PEREIRA, R.; SILVA, E.; IGNÁCIO, F.; LACERDA, T.; MEIRA, C. Utilização de ultrassonografia modo doppler como diagnóstico complementar da endometrite em éguas: relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 23, n. 1, p. 1-14, 2014.

PEREIRA, R. C. F.; DE LA CÔRTE, F. D.; BRASS, K. E.; da SILVA AZEVEDO, M.; GALLIO, M.; CANTARELLI, C.; et al. Evaluation of three methods of platelet-rich plasma for treatment of equine distal limb skin wounds. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 72, p. 1–7, 2019.

PICKET, B. W.; BURWASH, L. D.; VOSS, J. L.; BACK, D. G. Effect of seminal extenders on equine fertility. **Journal of Animal Science**, v. 40, n. 6, p. 1136–1143, 1975.

PORTUS, B. J.; REILAS, T.; KATILA, T. Effect of seminal plasma on uterine inflammation, contractility and pregnancy rates in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 6, p. 515–519, 2005.

PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. **Obstetrícia Veterinária**. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 303 p.

QUARTUCCIO, M.; CRISTARELLA, S.; MEDICA, P.; FAZIO, E.; MAZZULLO, G.; RIFICI, C.; et al. Endometrial cytology during the different phases of the estrous cycle in jennies: new evidences. **Animals**, v. 10, n. 6, p. 1062, 2020.

RAMIREZ, G. A.; YACOUN, M. R.; RIPA, M.; MANNINA, D.; CARIDDI, A.; SAPORITI, N.; et al. Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review. **BioMed Research International**, v. 2018, 9095275, 2018.

RASCH, K.; SCHOON, H. A.; SIEME, H.; KLUG, E. Histomorphological endometrial status and influence of oxytocin on the uterine drainage and pregnancy rate in mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 28, n. 6, p. 455–460, 1996.

REGHINI, M. F. S.; NETO, C. R.; SEGABINAZZI, L. G.; CASTRO CHAVES, M. M. B.; DELL'AQUA, C. P. F.; BUSSIÈRE, M. C. C.; et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 516-522, 2016.

RENDU, F.; BROHARD-BOHN, B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. **Platelets**, v. 12, n. 5, p. 261-273, 2001.

RENNER-MARTIN, T. F. P.; FORSTENPOINTNER, G.; WEISSENGRUBER, G. E.; et al. Gross Anatomy of the Female Genital Organs of the Domestic Donkey (*Equus asinus* Linné, 1758). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 38, n. 2, p. 133-138, 2009.

RIGBY, S. L.; BARHOUMI, R.; BURGHARDT, R. C.; COLLERAN, P.; THOMPSON, J. A.; VARNER, D. D.; et al. Mares with delayed uterine clearance have an intrinsic defect in myometrial function. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 740-747, 2001.

ROJER, H.; AURICH, C. Treatment of persistent mating-induced endometritis in mares with the non-steroid anti-inflammatory drug vedaprofen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. e458-e460, 2010.

ROSALES, C. Neutrophil: a cell with many roles in inflammation or several cell types? **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 324475, 2018.

ROTA, A.; PANZANI, D.; SABATINI, C.; CAMILO, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1846–1854, 2012.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The eosinophil. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p. 147–174, 2006.

SANCHEZ, R.; GOMEZ, I.; SAMPER, J. C. **Artificial Insemination with Frozen Semen**. In: SAMPER, J. *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2nd ed. St. Louis: Saunders, 2009. p. 175-183.

SCHLAFER, D. H. Equine endometrial biopsy: enhancement of clinical value by more extensive histopathology and application of new diagnostic techniques? **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 413-422, 2007.

SCHOFIELD, W. A. Use of acupuncture in equine reproduction. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 430-434, 2008.

SCOGGIN, C. F. Endometritis: Nontraditional Therapies. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 499–511, 2016.

SEGABINAZZI, L. G.; FRISO, A. M.; CORREAL, S. B.; CRESPILO, A.; DELL'AQUA JR, J. A.; MIRÓ, J.; et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. **Theriogenology**, v. 104, p. 120-126, 2017.

SEGABINAZZI, L. G. T. M.; CANISSO, I. F.; PODICO, G.; CUNHA, L. L.; NOVELLO, G.; ROSSER, M. F.; et al. Intrauterine blood plasma platelet-therapy mitigates persistent breeding-induced endometritis, reduces uterine infections, and improves embryo recovery in mares. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, 490, 2021.

SILVA, R. F.; CARMONA, J. U.; REZENDE, C. M. F. Intra-articular injections of autologous platelet concentrate in dogs with surgical reparation of cranial cruciate ligament rupture. **Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology**, v. 26, n 4, p. 285-290, 2013.

SLUSHER, S. H.; COWELL, R. L.; TYLER, R. D. **The Endometrium**. In: COWELL, R. L.; TYLER, R. D. (Eds.). *Cytology and Hematology of the Horse*. Maryland Heights, MO, USA: American Veterinary Publications, 1992. p. 173–180.

SNIDER, T. A.; SEPOY, C.; HOLYOAK, G. R. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1567-1581, 2011.

SOKKAR, S. M.; HAMOUDA, M. A.; EL-RAHMAN, S. M. Endometritis in she donkeys in Egypt. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 48, n. 7, p. 529-536, 2001.

SPENCER, L. A.; BONJOUR, K.; MELO, R. C.; WELLER, P. F. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 112203, 2014.

STOUT, T.; RUITJTER-VILLANI, M. Effect of post-breeding dexamethasone treatment on the uterine inflammatory reaction in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 60, 2012.

SWIFT, L. A.; CHRISTENSEN, B. W.; SAMOCHA, M. B.; LE JEUNE, S. S.; MILLARES-RAMIREZ, E. M.; DUJOVNE, G. A. Randomized comparative trial of acupuncture and exercise versus uterine Ecbolics in the treatment of persistent Postbreeding Endometritis in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 86, p. 102821, 2020.

TABERNER, E.; MEDRANO, A.; PEÑA, A.; RIGAU, T.; MIRÓ, J. Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in catalonian jennies. **Theriogenology**, v. 70, n. 9, p. 1489-1497, 2008.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, p. 3-9, 2004.

TIZARD, I. R. **Innate immunity: the recognition of invaders**. In: TIZARD, I. R. (Ed.). *Veterinary Immunology*. 8th ed. St. Louis, MO: Elsevier, 2008. p. 11–27.

TRIMECHE, A.; RENARD, P.; TAINTURIER, D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. **Theriogenology**, v. 50, n. 5, p. 793-806, 1998.

TROEDSSON, M. H.; LIU, I. K. Uterine clearance of non-antigenic markers (51Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 44, p. 283-288, 1991.

TROEDSSON, M. H. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-471, 1999.

TROEDSSON, M. H.; LOSET, K.; ALGHAMDI, A. M.; DAHMS, B.; CRABO, B. G. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, n. 3-4, p. 273-278, 2001.

TURNER, M. L.; HEALEY, G. D.; SHELDON, I. M. Immunity and inflammation in the uterus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 402-409, 2012.

VALENT, P.; GLEICH, G. J.; REITER, A.; ROUFOSS, F.; WELLER, P. F.; HELLMANN, A.; et al. Pathogenesis and classification of eosinophil disorders: a review of recent developments in the field. **Expert Review of Hematology**, v. 5, n. 2, p. 157-176, 2012.

VANDEAELE, H.; DAELS, P.; PIEPERS, S.; LEBLANC, M. M. Effect of post-insemination dexamethasone treatment on pregnancy rates in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 110-112, 2010.

VENDRAMINI, O.; GUINTARD, C.; MOREAU, J.; TAINTURIER, D. Cervix conformation: A first anatomical approach in baudet du poitou jenny asses. **Animal Science**, v. 66, n. 3, p. 741-744, 1998.

VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; FRANCO, T. R. Methods to obtain autologous platelet-rich plasma gel. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 24, n. 2, p. 212-218, 2009.

VENDRUSCOLO, C. P.; CARVALHO, A. M.; MORAES, L. F. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em medicina equina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 106-110, 2012.

VIDAMENT, M.; VICENT, P.; MARTIN, F. X.; MAGISTRINI, M.; BLESBOIS, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. **Animal Reproduction Science**, v. 112, n. 1-2, p. 22-35, 2009.

VILES, K.; RABANAL, R.; RODRIGUEZ-PRADO, M.; SNNI, J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. **Theriogenology**, v. 79, n. 7, p. 1019-1026, 2013a.

VILES, K.; RABANAL, R.; RODRÍGUEZ-PRADO, M.; MIRÓ, J. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. **Animal Reproduction Science**, v.143, p. 57-63, 2013b.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 221-232, 2000a.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000b.

WECHSLER, M. E.; MUNITZ, A.; ACKERMAN, S. J.; DRAKE, M. G.; JACKSON, D. J.; WARDLAW, A. J.; et al. Eosinophils in health and disease: a state-of-the-art review. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 96, n. 10, p. 2694-2707, 2021.

WILDT, D. E.; PUKAZHENTI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S.; HOWARD, J. G.; ROTH, T. L. Spermatology for understanding, managing and conserving rare species. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 811–824, 1995.

WOLF, C. A.; MASLCHITZKY, E.; GREGORY, R. M.; JOBBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Effect of corticotherapy on proteomics of endometrial fluid from mares susceptible to persistent postbreeding endometritis. **Theriogenology**, v. 77, n. 7, p. 1351-1359, 2012.

WOODWARD, E. M.; CHRISTOFFERSEN, M.; CAMPOS, J.; SQUIRES, E. L.; TROEDSSON, M. H. T. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**, v. 78, n. 3, p. 495-501, 2012.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. Equine breeding-induced endometritis: A review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 9, p. 673-682, 2013.

XUE, C.; HALL, A.; MARCHI, S.; BERNIER, P.; FRENCH, H.; GILBERT, R. O.; SEGABINAZZI, L. G. Two manual non-commercial preparation methods for platelet-rich plasma in donkeys (*Equus asinus*). **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 125, p. 104756, 2023.

ARTIGO 1

Artigo redigido segundo as normas da revista *Theriogenology*, ISSN 0093-691X, classificada como A1 pelo QUALIS – CAPES 2022.

Avaliação de sete protocolos manuais para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) na espécie asinina

RESUMO

A utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) tem se tornando frequente na prática clínica em medicina veterinária, no entanto, há uma grande variabilidade nos procedimentos de obtenção do mesmo, tornando os resultados variáveis. Na espécie asinina, pesquisas sobre o uso do PRP são escassas e há uma falta de padronização ainda maior nos métodos de obtenção desse biomaterial. Assim, o objetivo deste estudo foi comparar sete protocolos manuais para a preparação PRP na espécie asinina. Sete protocolos utilizando duas centrifugações (P1, P3, P5, P6 e P7) ou três centrifugações (P2 e P4) foram avaliados, variando quanto a força e o tempo de cada centrifugação. Para cada protocolo testado, foram coletados 15 mL de sangue de quatro fêmeas asininas (*Equus asinus*), híbridas com idade entre 5 e 15 anos da raça Pêga, em tubos com citrato de sódio a 3,2%. Após a primeira centrifugação (P1, P2, P3, P4 e P5: 120×g por 10 minutos; P6: 250×g por 10 minutos; P7: 400×g por 10 minutos), toda a fração sobrenadante foi acondicionada em tubos sem anticoagulante e centrifugada pela segunda vez (P1 e P2: 240×g por 10 minutos; P3 e P4: 600×g por 10 minutos; P5: 600×g por 20 minutos; P6: 2000×g por 10 minutos; P7: 1000×g por 10 minutos). Em seguida, 2/3 da superfície sobrenadante foi descartada das amostras referentes aos protocolos de dupla centrifugação (DC) e o 1/3 final foi considerado PRP. Para os protocolos com tripla centrifugação (TC), 50% do sobrenadante da superfície foi desprezado e o restante centrifugado pela terceira vez (P2 e P4: 2000×g por 10 minutos), sendo que após este processamento, 2/3 do sobrenadante da superfície foi descartado e o 1/3 final foi considerado PRP. As concentrações de plaquetas, leucócitos, hemácias e agregados plaquetários foram determinadas pelo método de contagem manual por um avaliador experiente. O P2 apresentou maior concentração de plaquetas do que os demais ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa dos valores da concentração de hemácias entre os grupos. O P3 apresentou maior contagem de leucócitos do que os métodos P6 e P7 ($p < 0,05$). O resultado da concentração de agregados plaquetários foi maior no P4 em relação ao P3 ($p < 0,05$). O processamento total durou aproximadamente 20 minutos para os grupos P1, P3, P6 e P7 e 30

minutos para P2, P4 e P5. Além disso, os grupos TC (1,5 a 1,8 mL) produziram metade do volume de PRP produzido pelos grupos DC (3,0 a 3,6 mL). Assim, P2 mostrou ser o mais eficiente devido a maior concentração plaquetária obtida e por não apresentar diferença em relação a contagem de leucócitos, hemácias e agregados plaquetários em relação aos demais protocolos.

Palavras-chave: Jumentos; Terapia Regenerativa; Fatores de Crescimento, Hemoderivado; Concentrado de plaquetas; Centrifugação.

ABSTRACT

The use of platelet-rich plasma (PRP) has become increasingly common in veterinary medicine practice, however there is great variability in the procedures used to obtaining it, leading to variable outcomes. In the donkey species, research on the use of PRP is scarce and there is even less standardization in methods for obtaining this biomaterial. This study aimed to compare seven manual protocols for PRP preparation in donkey species. Seven protocols using two centrifugations (P1, P3, P5, P6 and P7) or three centrifugations (P2 and P4) were evaluated, varying in terms of centrifugation force/strength and duration/time. For each protocol tested, 15 mL of blood was collected from four healthy female (*Equus asinus*), aged between 5 and 15 years of Pêga breed, into tubes containing 3.2% sodium citrate. After the first centrifugation (P1, P2, P3, P4 and P5: 120×g for 10 minutes; P6: 250×g for 10 minutes; P7: 400×g for 10 minutes), the entire supernatant fraction was transferred to tubes without anticoagulant and centrifuged a second time (P1 and P2: 240×g for 10 minutes; P3 and P4: 600×g for 10 minutes; P5: 600×g for 20 minutes; P6: 2000×g for 10 minutes; P7: 1000×g for 10 minutes). Then, 2/3 of the supernatant surface was discarded from the samples referring to the double centrifugation (DC) protocols and the final 1/3 was considered PRP. For triple centrifugation (TC) protocols, 50% of the surface supernatant was discarded and the remainder was centrifuged a third time (P2 and P4: 2000×g for 10 minutes), and after this processing, 2/3 of the surface supernatant was discarded and the final 1/3 was considered PRP. Platelets, leukocytes, erythrocytes and platelet aggregates concentrations were determined using a manual counting method by an experienced evaluator. P2 had a higher concentration of platelets than the others protocols ($p < 0.05$). There was no significant difference in erythrocytes concentration values between the groups. P3 had a higher leukocyte count than methods P6 and P7 ($p < 0.05$). The result of platelet aggregates concentration was higher in P4 than in P3 ($p < 0.05$). Total processing lasted/took approximately 20 minutes for groups P1, P3, P6 and P7 and 30 minutes for P2, P4 and P5. Furthermore, the TC groups (1.5 to 1.8 mL) produced half the volume of PRP produced by the DC groups (3.0 to 3.6 mL). Thus, P2 proved to be the most efficient due to the higher platelet concentration obtained and because it showed no difference in terms of leukocytes, erythrocytes and platelet aggregates in relation to the other protocols.

Keywords: Donkeys; Regenerative Therapy; Growth Factors, Blood Products; Platelet concentrate; Centrifugation.

1. INTRODUÇÃO

O PRP (Plasma Rico em Plaquetas) é um composto derivado do sangue total que apresenta alta concentração plaquetária. As plaquetas são compostas por grânulos que apresentam fatores de crescimento, como por exemplo o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), possuindo efeito terapêutico, imunomodulador, analgésico, anti-inflamatório, mitogênico e neovascular que estimulam o processo de cicatrização e a capacidade regenerativa de tecidos (MARX, 2001; ANITUA et al., 2004; MARX, 2004; ALVES & GRIMALT, 2017). A utilização do PRP tem aplicação multidisciplinar, mostrando resultados promissores, por exemplo, na medicina veterinária para o tratamento de lesões musculoesqueléticas, como osteoartrites, desmites, fraturas, tendinopatias, e lesões cutâneas (CARMONA et al., 2007; ARGÜELLES et al., 2008; KIM et al., 2009; MAIA, 2009; BOSCH et al., 2011; SILVA et al., 2013; PEREIRA et al., 2019; MONTANO et al., 2021). Na reprodução equina, estudos que testaram a infusão intrauterina com PRP observaram redução da reação inflamatória pós cobertura (METCALF, 2014; REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2017; SEGABINAZZI et al., 2021; ANDINO et al., 2023) e aumento das taxas de fertilidade (METCALF, 2014; SEGABINAZZI et al., 2017). Em jumentas, FARGHALI et al. (2022) relataram que infusões intrauterinas de PRP na fase de diestro em jumentas com endometrite infecciosa aguda restauraram a aparência normal do endométrio e reduziram o processo inflamatório.

A preparação manual é o método clássico de obtenção do PRP que consiste na separação das células vermelhas e brancas das plaquetas, devido suas diferentes densidades, por centrifugação. Desta forma, a primeira centrifugação é realizada para separar as frações do sangue, enquanto na segunda centrifugação, as plaquetas são concentradas, produzindo o plasma rico em plaquetas (PRP) e o plasma pobre em plaquetas (PPP) (FOSTER et al., 2009; EHRENFEST et al., 2009; ARNOCZKY et al., 2011). Segundo ANITUA (2004) concentrações superiores a 300.000 plaquetas/ μ L são suficientes para se obter efeitos terapêuticos. Apesar da facilidade e baixo custo desse tipo de processamento, existe a necessidade de preparo imediato para utilização do PRP, pois os fatores de crescimento são ativamente secretados dos grânulos alfa durante os primeiros 10 minutos após ocorrer a ativação plaquetária e mais de 95% de fatores pré-sintetizados são liberados na primeira hora (MARX, 2004), e de várias aplicações a depender do tratamento.

Em equinos, CARMONA et al. (2007) testou um protocolo com duas centrifugações para produção do PRP para tratamento da osteoartrite. Nesse estudo, o sangue coletado foi centrifugado a $120\times g$ por 5 minutos e, posteriormente, 50% da fração inferior plasmática foi novamente centrifugada a $240\times g$ por 5 minutos. O PRP foi considerado como 25% da segunda fração, obtendo média de 250.000 ± 7.180 plaquetas/ μL . SEGABINAZZI et al. (2017) utilizaram o método de centrifugação única ($120 \times g$ por 10 minutos) obtendo concentração plaquetária média de $354.236 \pm 17.540/\mu L$, enquanto SEGABINAZZI et al. (2021) optaram por duas centrifugações, sendo a primeira a $400\times g$ por 15 minutos e a segunda a $1000\times g$ por 10 minutos, apresentando média de 622.900 ± 144 plaquetas/ μL . Diferentes anticoagulantes também foram utilizados na preparação do PRP, principalmente 3,2% de citrato de sódio (CARMONA et al., 2007; REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2017), 3,8% de citrato de sódio (ARGÜELLES et al., 2006; MAIA et al., 2009) e citrato-fosfato-dextrose-adenina (CPDA) (PEREIRA et al., 2019; SEGABINAZZI et al., 2021; COLOMBO et al., 2022).

Em jumentas, FARGHALI et al. (2022) prepararam o PRP a partir da coleta de sangue em solução de citrato de sódio a 3,8%, seguida de uma centrifugação suave ($250\times g$ /10 min) seguida da separação do plasma com uma centrifugação forte ($2000\times g$ /10 min), de acordo protocolo anterior utilizado em cães (FARGHALI et al., 2017; FARGHALI et al., 2019). Neste estudo, utilizou-se concentração plaquetária mínima de $2.000.000/\mu L$. XUE et al. (2023) compararam dois protocolos, um método de centrifugação única ($120\times g$ por 10 minutos) e outro método com duas centrifugações, sendo a primeira a $400\times g$ por 15 minutos e a segunda a $1000\times g$ por 10 minutos e relataram que os dois protocolos são aplicáveis para produção do PRP na espécie asinina, mas que a centrifugação dupla produziu maior concentração de plaquetas, apesar da maior contaminação de leucócitos e hemácias que o método de centrifugação única. FANTINI et al. (2021) testaram o processo de centrifugação única a $133\times g$ por dois tempos de centrifugação diferentes (10 e 15 min) para produção do PRP em jumentas, usando citrato dextrose ácido (ACD) como anticoagulante, e apresentaram concentração plaquetária de 406.500 ± 27.290 e 479.500 ± 75.050 por μL , respectivamente.

Assim, atualmente existem diversos protocolos para preparação do PRP, e como consequência, não há padronização e consenso entre a melhor técnica de preparo, o que pode levar a resultados variáveis, em alguns casos insatisfatórios, e à limitação na comparação entre os mesmos (ARNOCZKY et al., 2011; DELONG et al., 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012; DHURAT et al., 2014). Na espécie asinina, ainda são escassos os trabalhos que comparam diferentes protocolos para sua produção (FANTINI et al., 2021), reforçando a utilização de técnicas baseando-se em outras espécies, o que pode contribuir para a variabilidade dos

resultados e diminuir a possibilidade de êxito. Desta forma, estudos que avaliem diferentes técnicas para a obtenção de PRP são altamente desejáveis nesta espécie. Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivo comparar sete protocolos manuais de preparação do PRP na espécie asinina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos éticos do estudo

O estudo foi conduzido de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV), conforme protocolo 025/2021.

2.2. Animais e local de pesquisa

A pesquisa foi realizada na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, campus Viçosa - MG (Latitude 20° 44' 58" S e Longitude 42° 51' 10" O), no ano de 2023. Durante o experimento, foram utilizadas quatro fêmeas asininas (*Equus asinus*), com idade entre 5 e 15 anos, da raça Pêga e consideradas clinicamente saudáveis. Os animais foram mantidos a pasto (capim *Paspalum notatum*) com oferta de 1 kg de ração/dia, capim picado (*Pennisetum purpureum* cv. Cameron) e água e sal mineral *ad libitum*.

2.3. Processamento do PRP

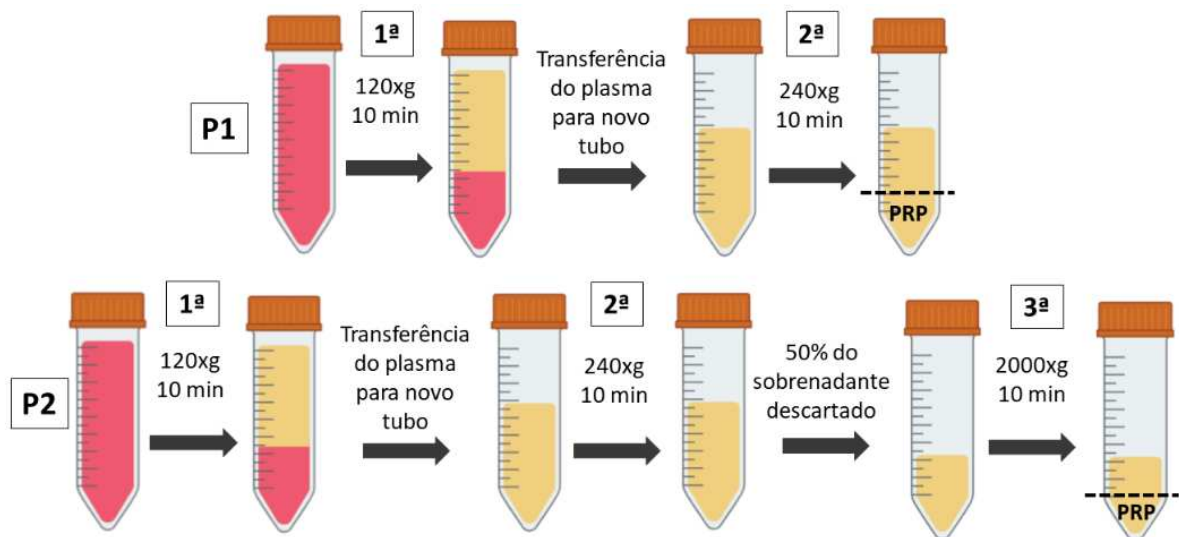
Foram coletados 15 mL de sangue total por punção da veia jugular externa em tubos tipo falcon contendo citrato de sódio a 3,2% de cada animal para cada um dos sete protocolos testados. Os tubos com sangue passaram por dupla centrifugação (DC) ou tripla centrifugação (TC), sendo que a força e o tempo de cada centrifugação variaram de acordo com o protocolo (grupo pertencente), conforme apresentado na Tabela 1.

Após a primeira centrifugação, cujo objetivo foi separar o plasma sanguíneo dos eritrócitos, toda a fração sobrenadante foi acondicionada em tubos falcon sem anticoagulante e centrifugada pela segunda vez. Em seguida, 2/3 da superfície sobrenadante foi descartada das amostras referentes aos protocolos DC (P1, P3, P5, P6, P7) e o 1/3 final foi considerado PRP. Para os protocolos TC (P2 e P4), 50% do sobrenadante da superfície foi desprezado e o restante

centrifugado pela terceira vez, sendo que após este processamento, 2/3 do sobrenadante da superfície foi descartado e o 1/3 final foi considerado PRP (Figura 1).

Tabela 1. Variação de força, tempo e número de centrifugações entre os grupos.

Grupos	1ª Centrifugação		2ª Centrifugação		3ª Centrifugação		Fonte
	Força (g)	Tempo (min)	Força (g)	Tempo (min)	Força (g)	Tempo (min)	
P1	120	10	240	10	-	-	CARMONA et al (2007) adaptado
P2	120	10	240	10	2000	10	Protocolo proposto
P3	120	10	600	10	-	-	Protocolo proposto
P4	120	10	600	10	2000	10	Protocolo proposto
P5	120	10	600	20	-	-	Protocolo proposto
P6	250	10	2000	10	-	-	FARGHALI et al. (2022)
P7	400	10	1000	10	-	-	SEGABINAZZI et al. (2021) adaptado



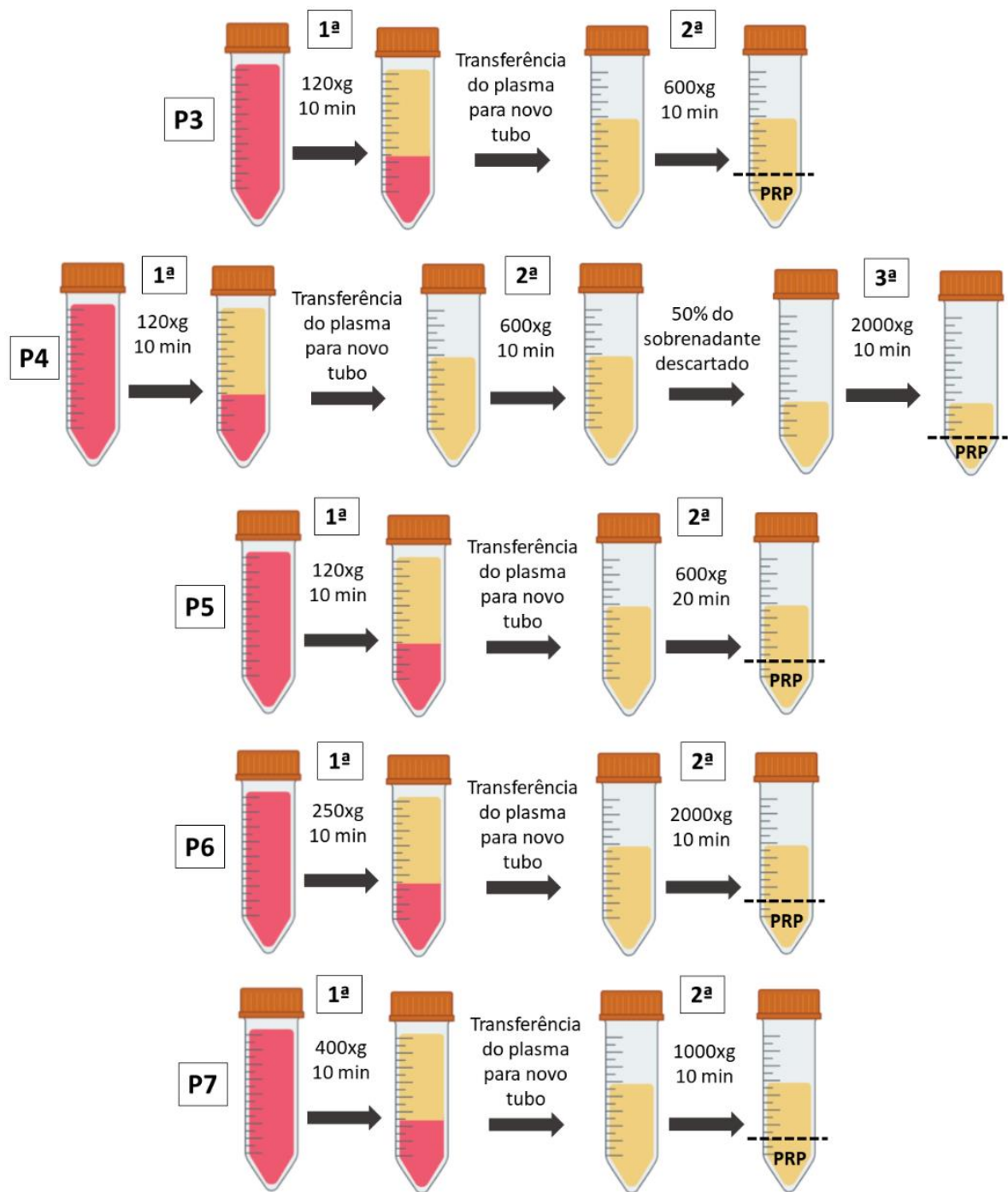


Figura 1. Esquematização dos protocolos (P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7) utilizados para produção do plasma rico em plaquetas (PRP) em asininos.

2.4. Avaliação das amostras

As concentrações de plaquetas, leucócitos, hemácias e agregados plaquetários foram obtidas pelo método de contagem manual através da Câmara de Neubauer. A princípio, uma amostra do PRP produzida a partir de cada protocolo foi diluída em solução Rees-Eckert

(Imbralab®, SP/Brasil) (diluição 1:50) e deixada de repouso por 5 minutos. Após este tempo, a Câmara de Nebauer foi preenchida e colocada em câmara umidificada por 20 minutos, durante a sedimentação, para posterior contagem em microscópio óptico.

2.5. Análises estatísticas

O pressuposto de distribuição normal foi avaliado considerando uma abordagem matemática (teste de Shapiro Wilk) e visual (figura QQ plot). O teste ANOVA foi utilizado para comparar a média da variável plaquetas entre os diferentes protocolos. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferença estatística significativa considerada quando $p < 0.05$.

A comparação da mediana das variáveis: leucócitos, hemácias e agregados plaquetários, entre os diferentes protocolos, foi realizada utilizando o teste não paramétrico Kruskal Wallis. Os resultados são mostrados como mediana (min e max). Diferença estatística significativa considerada quando $p < 0.05$. O pacote estatístico utilizado foi GraphPad Prism versão 9.3.0.

3. RESULTADOS

A concentração plaquetária por microlitro (μL) para cada grupo testado está presente na Tabela 2. O P2 apresentou maior contagem de plaquetas ($p < 0,05$), enquanto os P1, P3, P4, P5, P6 e P7 não foram significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$). Porém, houve tendência de o P4 apresentar maior concentração de plaquetas do que o P7 ($p = 0,0745$).

Tabela 2. Médias e erros-padrão das médias da concentração de plaquetas por microlitro (μl) de PRP em cada grupo testado.

Grupos	Plaquetas	Volume (mL)*	Tempo (min)*
P1	673.750 \pm 125.391 ^B	3,0 a 3,8	20
P2	1.405.625 \pm 107.956 ^A	1,5 a 1,9	30
P3	850.000 \pm 21.090 ^B	3,0 a 3,8	20
P4	940.625 \pm 59.559 ^B	1,5 a 1,9	30
P5	841.875 \pm 85.916 ^B	3,0 a 3,8	30
P6	761.875 \pm 87.437 ^B	3,0 a 3,8	20
P7	631.250 \pm 35.831 ^B	3,0 a 3,8	20

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

* Valores aproximados.

Em geral, como indicado na Tabela 2, o processamento total durou aproximadamente 20 minutos para os grupos P1, P3, P6 e P7 e aproximadamente 30 minutos para os protocolos P2, P4 e P5. Além disso, os grupos TC (1,5 a 1,9 mL) produziram metade do volume de PRP produzido pelos grupos DC (3,0 a 3,8 mL).

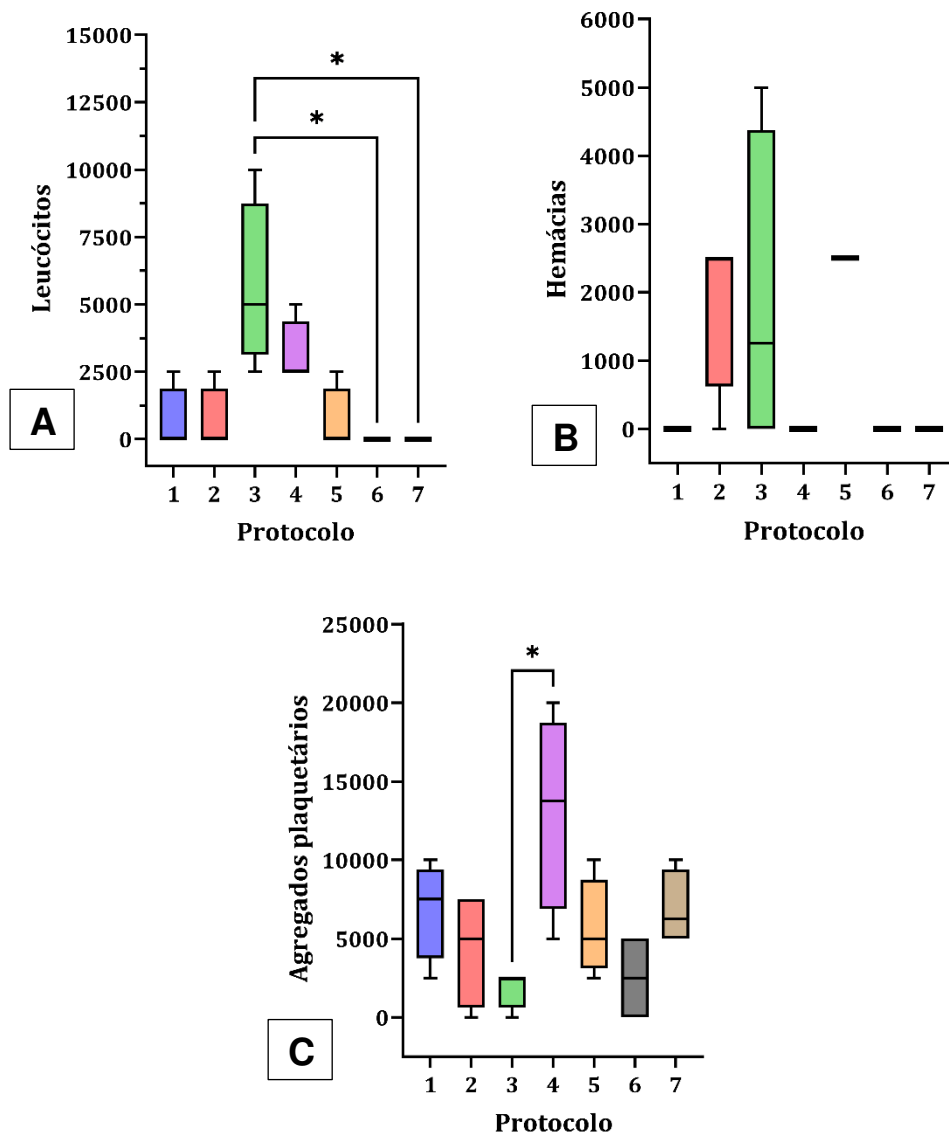


Figura 2. Medianas e intervalos interquartis da concentração de leucócitos (A), hemácias (B) e agregados plaquetários (C) por microlitro (μL) de PRP em cada protocolo testado. *Indica diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

A contagem de leucócitos apresentou maior concentração por μL do P3 em relação aos grupos P6 e P7 ($p < 0,05$) e não apresentou diferença significativa aos demais grupos (P1, P2, P4 e P5) ($p > 0,05$), como mostra a Figura 2A. Desta forma, os grupos P1, P2, P4, P5, P6 e P7 não foram significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$).

Os valores da concentração por μL de hemácias não foram estatisticamente diferentes entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 2B), porém o P5 apresentou tendência de maior concentração de hemácias em relação aos métodos P1, P4, P6 e P7 ($p=0,093$). Uma amostra do protocolo P7 sofreu hemólise durante o processamento.

A Figura 2C indica maior concentração, por μL , de agregados plaquetários na amostra do P4 em relação ao P3 ($p<0,05$) e não indicou diferença significativa aos demais grupos (P1, P2, P5, P6 e P7) ($p>0,05$). Assim, os grupos P1, P2, P3, P5, P6 e P7 não foram estatisticamente diferentes entre si ($p>0,05$).

4. DISCUSSÃO

Atualmente existem diversos protocolos descritos para obtenção do PRP, não havendo padronização e consenso entre as técnicas de preparo, gerando resultados com eficiências terapêuticas variáveis e limitando a comparação entre os mesmos (ARNOCZKY et al., 2011; DELONG et al., 2012; VENDRUSCOLO et al., 2012; DHURAT et al., 2014). Na espécie asinina, há alguns estudos que demonstraram o uso do PRP no tratamento de condições musculoesqueléticas (ALJOBORY, 2009; MOSTAFA et al., 2015a; MOSTAFA et al., 2015b; SAMY et al., 2017; MOSTAFA et al., 2020), no tratamento da endometrite (FARGHALI et al., 2022) e que comparam diferentes protocolos para sua produção (FANTINI et al., 2021). Assim, a utilização de técnicas baseando-se em outras espécies, como a espécie equina, é reforçada, podendo contribuir para resultados insatisfatórios e variáveis. Este é o primeiro estudo que compara sete protocolos manuais de preparo do PRP para a espécie asinina. Além disso, também não foram encontrados trabalhos referentes a preparação com tripla centrifugação.

Todos os métodos foram selecionados ou propostos por possuírem preparação manual através do uso de centrífugas devido à facilidade e ao baixo custo durante o processamento, permitindo aplicação na prática reprodutiva. A quantificação de plaquetas, hemácias, leucócitos e agregados plaquetários foi realizada através da contagem manual, pois aparelhos automáticos podem subestimar os valores, permitindo que as amostras se estabilizem e identificando agregados como uma única célula, enquanto no método manual as plaquetas são contadas individualmente (MARX, 2000; DELONG et al., 2012). Porém, o tempo total de preparação e a quantidade de volume de PRP produzido varia de acordo com o método utilizado.

Segundo MARX (2004), a preparação do concentrado plaquetário deve ser simples e fácil de executar, com as plaquetas facilmente separadas das hemácias e sequestradas em altas concentrações sem sofrer danos, com o intuito de secretar ativamente seus fatores de

crescimento. Todos os protocolos testados foram eficientes na concentração plaquetária, porém o protocolo P2, de tripla centrifugação, foi o mais eficiente ao apresentar maior número de plaquetas, resultando em concentrações de 1,49 a 2,23 vezes maiores do que os demais protocolos. Métodos com uma ou duas centrifugações são os mais relatados na literatura, sendo observado por alguns estudos (NAGATA et al., 2010; SAQLAIN et al., 2023) que os protocolos com dupla centrifugação obtiveram maiores concentrações plaquetárias do que com centrifugação simples.

De forma geral, os grupos TC apresentaram maior tempo de processamento para a obtenção do PRP, devido ao acréscimo de mais uma centrifugação, e menor volume final que os de DC, devido ao maior descarte de plasma durante o preparo. A maioria dos protocolos usados na clínica veterinária utilizam pequeno volume de PRP para tratamentos de lesões musculoesqueléticas. MAIA et al. (2009) utilizaram 2,5 mL de PRP para testar o efeito no tratamento da tendinopatia induzida no tendão flexor digital superficial em equinos. PEREIRA et al. (2024) avaliaram o efeito da aplicação intra-articular de 4 ml de PRP em cavalos com osteocondrite dissecante. Porém, é necessário um volume maior para atingir toda a superfície do endométrio, por exemplo de 10 a 60 mL (SEGABINAZZI et al., 2017; CANISSO et al., 2020). Alguns estudos em éguas (REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2017) e jumentas (FARGHALI et al., 2022) utilizaram 20 mL de PRP em cada infusão para terapia intrauterina, enquanto o volume utilizado por SEGABINAZZI et al. (2021) foi de 40 mL de PRP e por ANDINO et al. (2023) foi de 10 mL de PRP + PPP.

Além disso, ao comparar protocolos com DC e TC, foi observado que o acréscimo da terceira centrifugação a 2000×g por 10 minutos apresentou maior concentração de plaquetas no P2 (quando comparado ao P1). O protocolo P1 é uma adaptação do modelo utilizado em equinos por CARMONA et al. (2007), que relataram concentração de 250.000 ± 7.180 plaquetas/ μL em equinos ao utilizar um protocolo com duas centrifugações, sendo a primeira a 120×g por 5 minutos e a segunda a 240×g por 5 minutos. VENDRUSCOLO et al. (2012) também adaptaram o protocolo descrito por CARMONA et al. (2007) e demonstraram contagem média de 363.600 ± 31.889 de plaquetas por μL em equinos ao testar 120×g por 10 minutos na primeira centrifugação e 240×g por 10 minutos na segunda centrifugação e considerar PRP como 50% do plasma da porção inferior após a segunda centrifugação. Desta forma, o P1 apresentou resultados superiores (673.750 ± 125.391 plaquetas/ μL) ao descrito em equinos em relação à concentração de plaquetas. O protocolo P7 apresentou concentração de 631.250 ± 35.831 plaquetas/ μL , resultado semelhante ao trabalho em equinos ao qual o mesmo foi adaptado (622.900 ± 144 plaquetas/ μL) (SEGABINAZZI et al., 2021). Da mesma forma, o grupo P6 é

uma adaptação do modelo proposto por FARGHALI et al. (2022) em jumentas, porém a concentração de plaquetas obtida no presente estudo (761.875 ± 87.437 plaquetas/ μL) foi inferior ao relatado previamente (2.000.000 plaquetas/ μL).

Os agregados plaquetários são compostos por plaquetas que uniram entre si, podendo variar em tamanho e estrutura, desde pequenas aglomerações até estruturas maiores. Desta forma, os agregados não são desejáveis, pois podem levar a distribuição desigual das plaquetas e ativar prematuramente plaquetas ou fatores de coagulação no PRP. Portanto, é crucial adotar medidas rigorosas durante o processo de preparação, como manuseio cuidadoso, protocolo de centrifugação adequado e evitar coletas traumáticas, para minimizar a formação de agregados plaquetários (RINGWALD et al., 2013). Nenhum método apresentou agregados macroscópicos, porém aglomerações microscópicas foram identificadas em todos os protocolos, sugerindo que sua formação pode ocorrer mesmo em protocolos mais cuidadosos. Além disso, ao comparar protocolos com DC e TC, foi observado que o acréscimo da terceira centrifugação a $2000\times g$ por 10 minutos apresentou maior concentração de agregados plaquetários no P4 (quando comparada ao P3), indicando que o protocolo de centrifugação pode influenciar a formação de agregados plaquetários.

Algumas técnicas descritas para preparação do PRP incluem células sanguíneas contaminantes, como os leucócitos e hemácias, no produto final. As hemácias têm capacidade de liberar compostos que promovem a dilatação dos vasos sanguíneos, tais como trifosfato de adenosina e óxido nítrico. Além disso, em certas condições, como estresse oxidativo, as moléculas heme presentes na hemoglobina podem se tornar livres e citotóxicas. O ferro contido nessas moléculas pode catalisar a formação de radicais livres, que são espécies reativas de oxigênio altamente reativas e podem causar danos às células, lipídios, proteínas e DNA e induzir processos inflamatórios. Assim, não é benéfica a presença de glóbulos vermelhos em uma preparação de PRP (BOSWELL et al., 2012; EVERTS et al., 2019). No presente estudo, os protocolos P2, P3 e P5 apresentaram contaminação por hemácias, porém não foram estatisticamente diferentes dos demais grupos. Da mesma forma, a presença de hemólise, como ocorreu em uma amostra do P7, resultado da elevada força de cisalhamento durante a coleta de sangue ou do processo de centrifugação inadequado, pode afetar negativamente a qualidade e a eficácia terapêutica do PRP devido a liberação de hemoglobina (SCHAER et al., 2013; EVERTS et al., 2019).

Apesar da influência dos leucócitos nas fases do processo inflamatório e dos relatos favoráveis sobre a utilização do PRP enriquecido com leucócitos (BIELECKI et al., 2007; EVERTS et al., 2007; MOOJEN et al., 2008; EHRENFEST et al., 2009; BIELECKI et al.,

2012), permanece incerto o verdadeiro impacto da concentração de leucócitos na eficácia do PRP, gerando debates sobre os benefícios e contraindicações de sua inclusão (ARNOCZKY et al., 2011). Há uma preocupação de que seus efeitos pró-inflamatórios e imunológicos possam, igualmente, induzir danos celulares e teciduais que contradizem os efeitos curativos pretendidos da terapia com PRP (WU et al., 2016). Os leucócitos têm a capacidade de liberar metaloproteinases de matriz e gerar espécies reativas de oxigênio, podendo resultar em danos teciduais (TIDBALL, 2005; BOSWELL et al., 2012). Além disso, foram observados níveis mais elevados de fatores pró-inflamatórios, como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α e fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF-2), em preparações de concentrados de plaquetas com maior concentração de leucócitos (MUYLLE et al., 1993; MUYLLE & PEETERMANS, 1994; STACK & SNYDER, 1994; AYE et al., 1995; MCCARREL et al., 2012; BRAUN et al., 2014; ASSIRELI et al., 2015). No presente estudo, os protocolos P6 e P7 não apresentaram presença de leucócitos nas amostras, porém somente o método P3 demonstrou ser menos eficiente em reduzir a quantidade de leucócitos. Sendo assim, protocolos com maior força de centrifugação nas duas centrifugações (P6 e P7) apresentaram, quando comparados aos demais grupos DC, resultados similares (P1 e P5) ou inferiores (P3) de leucócitos nas amostras.

A força centrífuga e o tempo determinam o empacotamento das hemácias na camada inferior, o volume do plasma na camada superior e a eficiência de recuperação das plaquetas (PEREZ et al., 2014). O aumento da força na segunda centrifugação no P3 (600 \times g), quando comparado ao P1 (240 \times g), não resultou em variação na concentração de plaquetas, leucócitos, hemácias e agregados plaquetários. O aumento do tempo da segunda centrifugação do P5 (20 minutos) em relação ao P3 (10 minutos) não apresentou influência nas variáveis avaliadas. VENDRUSCOLO et al. (2012) também não observaram influência do tempo na concentração de plaquetas ao testar diferentes protocolos manuais de obtenção do PRP em equinos.

Como limitação, o presente estudo não abordou avaliação de viabilidade plaquetária das amostras, regulação de citocinas e efeitos clínicos, características adicionais que poderiam auxiliar nas observações sobre a eficiência de cada protocolo testado.

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, todos os protocolos avaliados foram eficientes em concentrar plaquetas para obtenção do PRP. O melhor protocolo testado foi o P2 devido a maior concentração plaquetária observada e por não apresentar diferença dos demais protocolos em relação a contagem de leucócitos, hemácias e agregados plaquetários. O acréscimo da terceira

centrifugação ao protocolo pode aumentar a concentração de plaquetas, mas também de agregados plaquetários. No entanto, estudos adicionais são necessários para avaliar a viabilidade das plaquetas e a eficácia clínica dos protocolos testados.

REFERÊNCIAS

Aljobory AK. An experimental study of the effect of autologous platelet-rich plasma on the healing process of tendon in donkeys. *Iraqi J Vet Sci.* 2009;23(Suppl D):81-5.

Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord.* 2017;4(1):18–24.

Andino AP, Cumbicus AM, Affonso FJ, Serrano-Recalde EC. Mitigation of post breeding endometritis in mares treated with platelet rich plasma. *J Equine Vet Sci.* 2023;125:104688.

Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004;91(1):4-15.

Argüelles D, Carmona JU, Pastor J, Iborra A, Viñals L, Martínez P, et al. Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Res Vet Sci.* 2006;81(2):237–45.

Argüelles D, Carmona JU, Climent F, Muñoz E, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment for musculoskeletal lesions in five horses. *Vet Rec.* 2008;162(7):208-11.

Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA. What is platelet-rich plasma?. *Oper Tech Sports Med.* 2011;19(3):142-48.

Assirelli E, Filardo G, Mariani E, Kon E, Roffi A, Vaccaro F, et al. Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23:2690-703.

Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, Hashemi S. Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion.* 1995;35(2):117-24.

Bielecki TM, Gazdzik TS, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(3):417-20.

Bielecki T, Dohan Ehrenfest MD, Everts PA, Wiczowski A. The role of leukocytes from L-PRP/L-PRF in wound healing and immune defense: new perspectives. *Curr Pharm Biotechnol.* 2012;13(7):1153-62.

Bosch G, Moleman M, Barneveld A, van Weeren PR, van Schie HT. The effect of platelet-rich plasma on the neovascularization of surgically created equine superficial digital flexor tendon lesions. *Scand J Med Sci Sports.* 2011;21:554-61.

Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA. Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*. 2012;28(3):429-39.

Braun HJ, Kim HJ, Chu CR, Dragoo JL. The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy. *Am J Sports Med*. 2014;42(5):1204-10.

Carmona JU, Arguelles D, Climent F, Prades M. Autologous platelet concentrates as a treatment of horses with osteoarthritis: a preliminary pilot clinical study. *J Equine Vet Sci*. 2007;17:167-70.

DeLong JM, Russell RP, Mazzocca AD. Platelet-rich plasma: the PAW classification system. *Arthroscopy*. 2012;28(7):998-1009.

Dhurat R, Sukesh MS. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J Cutan Aesthet Surg*. 2014;7(4):189-97.

Ehrenfest DMD, et al. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158-67.

Everts P, Overdevest EP, Jakimowicz JJ, Oosterbos CJ, Schönberger JP, Knappe JT, et al. The use of autologous platelet-leukocyte gels to enhance the healing process in surgery, a review. *Surg Endosc*. 2007;21:2063-8.

Everts PA, Malanga GA, Paul RV, Rothenberg JB, Stephens N, Mautner KR. Assessing clinical implications and perspectives of the pathophysiological effects of erythrocytes and plasma free hemoglobin in autologous biologics for use in musculoskeletal regenerative medicine therapies. A review. *Regen Ther*. 2019;11:56-64.

Fantini P, Jiménez R, Vilés K, Iborra A, Palhares MS, Catalán J, et al. Simple Tube Centrifugation Method for Platelet-Rich Plasma (PRP) Preparation in Catalonian Donkeys as a Treatment of Endometritis-Endometrosis. *Animals*. 2021;11(10):2918.

Farghali HA, Abdelkader NA, Khattab MS, Abubakr HO. Evaluation of subcutaneous infiltration of autologous platelet-rich plasma on skin-wound healing in dogs. *Biosci Rep*. 2017; 37(2).

Farghali HA, AbdElKader NA, AbuBakr HO, Aljuaydi SH, Khattab MS, Elhelw R, et al. Antimicrobial action of autologous platelet-rich plasma on MRSA-infected skin wounds in dogs. *Sci Rep*. 2019;9(1):12722.

Farghali HA, Abdelkader NA, Fathi M, Emam IA, Abubakr HO, Alijuaydi SH, et al. The efficiency of intrauterine infusion of platelet-rich plasma in the treatment of acute endometritis as assessed by endoscopic, Doppler, oxidative, immunohistochemical, and gene expression alterations in jennies. *Theriogenology*. 2022;181:147-60.

Kim JH, Park C, Park HM. Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol*. 2009;20(2):123-26.

- Maia L, de Souza MV, Júnior JIR, Oliveira, AC, Alves GES, Anjos Benjamin L, et al. Platelet-Rich Plasma in the Treatment of Induced Tendinopathy in Horses: Histologic Evaluation. *J Equine Vet Sci.* 2009;29(8):618–26.
- Marx RE. Platelet concentrate: A strategy for accelerating and improving bone regeneration. In: Davies JE, ed. *Bone Engineering*. Toronto: University of Toronto; 2000. p. 447-53
- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP). What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent.* 2001;10(4):225-28.
- Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62:489-96.
- McCarrel TM, Minas T, Fortier LA. Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94(19):e143.
- Metcalf ES, Scoggin K, Troedsson MHT. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition (Abstract). *J Equine Vet Sci.* 2012;32(8):498.
- Metcalf ES. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistente mating-induced endometritis (PMIE). *J Equine Vet Sci.* 2014;34:128.
- Montano C, Auletta L, Greco A, Costanza D, Coluccia P, Del Prete C, et al. The use of platelet-rich plasma for treatment of tenodesmic lesions in horses: a systematic review and meta-analysis of clinical and experimental data. *Animals.* 2021;11(3):793.
- Moojen DJF, Everts PA, Schure RM, Overdevest EP, Van Zundert A, Knape JT, et al. Antimicrobial activity of platelet-leukocyte gel against *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 2008;26(3):404-10.
- Mostafa MB, Al-Akraa AM, Khalil AH. Ultrasonographic assessment of superficial digital flexor tendon (SDFT) core lesion treated with platelet-rich plasma (PRP) in donkeys (*Equus asinus*). *Benha Vet Med J.* 2015a;29(2):274-82.
- Mostafa MB, Al-Akraa AM, Khalil AH. Clinical assessment of superficial digital flexor tendon (SDFT) core lesion treated with Platelet Rich Plasma (PRP) in donkeys (*Equus asinus*). *Int J.* 2015b;3(10):371-81.
- Mostafa M, Khalil A, Al-Akraa A. Platelet Rich Plasma in the Treatment of Superficial Digital Flexor Tendon Core Lesion in Donkeys: Histopathological Assessment. *Agric Sci Digest Res J.* 2020;40(1):84-8.
- Muyllle L, Joos M, Wouters E, De Bock R, Peetermans ME. Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion.* 1993;33(3):195-99.

Muylle L, Peetermans ME. Effect of prestorage leukocyte removal on the cytokine levels in stored platelet concentrates. *Vox Sang*. 1994;66(1):14-7.

Nagata MJ, Messori MR, Furlaneto FA, Fucini SE, Bosco AF, Garcia VG, et al. Effectiveness of two methods for preparation of autologous platelet-rich plasma: an experimental study in rabbits. *Eur J Dent*. 2010;4(4):395-402.

Pereira RCF, De La Côte FD, Brass KE, da Silva Azevedo M, Gallio M, Cantarelli C, et al. Evaluation of three methods of platelet-rich plasma for treatment of equine distal limb skin wounds. *J Equine Vet Sci* 2019;72:1-7

Pereira MF, Ribeiro G, Gonzales A, Arantes JA, Dória RG. Effects of intra-articular administration of hyaluronic acid or platelet-rich plasma as a complementary treatment to arthroscopy in horses with osteochondritis dissecans. *Vet Anim Sci*. 2024;23:100330.

Perez AG, Lana JFS, Rodrigues AA, Luzo ACM, Belangero WD, Santana MHA. Aspectos relevantes da etapa de centrifugação na preparação de plasma rico em plaquetas. *Avisos Int Pesq Acad*. 2014;1:176060.

Reghini MFS, Neto CR, Segabinazzi LG, Castro Chaves MMB, Dell'Aqua CPF, Bussiere MCC, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*. 2016;86(2):516-22.

Ringwald J, Antoon M, Eckstein R, Cardoso M. Residual aggregates in platelet products: what do we know?. *Vox Sanguinis*. 2013; 106(3): 209-218.

Samy MT, Omar MS, Elseddawy FD, Eisa E, Metwally MM. Influence of Platelets Rich Plasma on Repair of Superficial Digital Flexor Tendon Rupture in Donkeys (An Experimental Study). *Zagazig Vet J*. 2017;45(3):283-91.

Saqlain N, Mazher N, Fateen T, Siddique A. Comparison of single and double centrifugation methods for preparation of Platelet-Rich Plasma (PRP). *Pak J Med Sci*. 2023;39(3):634.

Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*. 2013;121(8):1276-84.

Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho A, Dell'Aqua Jr JA, Miró J, et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*. 2017;104:120-26.

Segabinazzi LGTM, Canisso IF, Podico G, Cunha LL, Novello G, Rosser MF, et al. Intrauterine blood plasma platelet-therapy mitigates persistent breeding-induced endometritis, reduces uterine infections, and improves embryo recovery in mares. *Antibiotics*. 2021;10(5):490.

Silva RF, Carmona JU, Rezende CMF. Intra-articular injections of autologous platelet concentrates in dogs with surgical reparation of cranial cruciate ligament rupture. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2013;26(04):285-90.

Stack G, Snyder EL. Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion*. 1994;34(1):20-5.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288(2):R345-53;

Vendruscolo CP, Carvalho AM, Moraes LF. Avaliação da eficácia de diferentes protocolos de preparo do Plasma Rico em Plaquetas para uso em medicina equina. *Pesq Vet Bras*. 2012;32:106-10.

Wu PI-K, Diaz R, Borg-Stein J. Platelet-Rich Plasma. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2016;27(4):825–53.

Xue C, Hall A, Marchi S, Bernier P, French H, Gilbert RO, Segabinazzi LG. Two manual non-commercial preparation methods for platelet-rich plasma in donkeys (*Equus asinus*). *J Equine Vet Sci*. 2023;125:104756.

ARTIGO 2

Artigo redigido segundo as normas da revista *Theriogenology*, ISSN 0093-691X, classificada como A1 pelo QUALIS – CAPES 2022.

Is platelet-rich plasma (PRP) effective in treating uterine inflammation in jennies inseminated with cryopreserved donkey semen?

RESUMO

O sêmen asinino congelado, apesar de frequentemente apresentar alta qualidade após o descongelamento e alcançar resultados satisfatórios de fertilidade em éguas, produz índices insatisfatórios em jumentas, possivelmente devido à resposta inflamatória uterina mais pronunciada observada nessa espécie após interagir com este tipo de sêmen. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do plasma rico em plaquetas (PRP) na reação inflamatória uterina e na fertilidade de jumentas inseminadas com sêmen criopreservado de asininos. Onze jumentas (*Equus asinus*) contribuíram com 65 ciclos estrais no total aleatoriamente designados para três grupos: (1) sem tratamento (CT; controle) (n=22); (2) infusão única de PRP 30 horas após a indução da ovulação, antes da inseminação artificial (PRP PRÉ) (n=22); e (3) duas infusões de PRP: 30 horas após a indução da ovulação, antes da IA, e 4 horas após a IA (PRP PRÉ+PÓS) (n=21). Metade dos ciclos em cada grupo foi dedicada à avaliação da resposta inflamatória uterina (fase experimental 1), enquanto a outra metade focou na avaliação da fertilidade (fase experimental 2). A IA foi realizada com o sêmen descongelado no ápice do corno uterino ipsilateral à ovulação (T0). Na fase 1, edema endometrial, líquido intrauterino (LIU), vascularização e perfil de células em esfregaço citológico foram avaliados previamente à IA e ao tratamento (tempo controle, TP), e após 6h (T6), 24h (T24) e 48h (T48) da IA. Além disso, biópsias uterinas foram realizadas no T48 para avaliação histopatológica e quantificação de colágeno e dosagem hormonal de progesterona (P4) foram medidos 5 dias após a IA (D5). O grupo PRP PRÉ apresentou menor acúmulo de LIU do que o grupo CT no T6, porém todos os grupos apresentaram ausência de LIU entre T24 e T48. Outros parâmetros não diferiram significativamente entre os grupos. A análise citológica revelou elevada porcentagem de células inflamatórias no T6 em todos os grupos, seguida de redução nas horas seguintes. Para o grupo CT, o percentual de neutrófilos no T24 foi similar ao TP, enquanto que para os demais grupos esta similaridade foi alcançada no T48. A avaliação histopatológica demonstrou acentuada infiltração neutrofílica e eosinofílica no T48 em todos os grupos, demonstrando que a inflamação não estava completamente solucionada. Na fase 2, taxas de fertilidade aos 14 dias pós IA (D14)

não diferiram significativamente entre os grupos (CT: 0%, PRP PRÉ: 0% e PRP PRÉ+PÓS: 10%). Os resultados indicam que os tratamentos com PRP foram ineficazes na modulação da resposta inflamatória uterina e não melhoraram a fertilidade em jumentas inseminadas com sêmen congelado de jumento.

Palavras-chave: Endometrite; Asininos; Fertilidade; Sêmen congelado; Concentrado de plaquetas.

ABSTRACT

Despite frozen donkey semen often exhibits high quality after thawing and achieves satisfactory fertility results in mares, it yields unsatisfactory rates in jennies, possibly due to the pronounced uterine inflammatory response observed in this species after interacting with this type of semen. This study aimed to assess the effects of platelet-rich plasma (PRP) on the uterine inflammatory response and fertility of jennies inseminated with frozen donkey semen. Eleven jennies contributed a total of 65 estrous cycles, that were randomly assigned to three groups: (1) no treatment (CT; control) (n=22); (2) single PRP infusion 30h after ovulation induction, prior to AI (PRE PRP) (n=22); (3) two PRP infusions: treatments 30h after ovulation induction, prior to AI, and 4 hours after AI (PRE+POST PRP) (n=21). Half of the cycles in each group was dedicated to evaluating uterine inflammatory response (experimental phase 1), while the other half focused on fertility evaluation (experimental phase 2). AI was performed using thawed semen at the apex of the uterine horn ipsilateral to ovulation (T0). In phase 1, endometrial edema, intrauterine fluid (IUF), uterine blood perfusion and cytological cell profile were evaluated before AI and treatment (control time, PT), as well at 6 hours (T6), 24 hours (T24) and 48 hours (T48) post AI. Additionally, uterine biopsies were taken at T48 for histopathological evaluation and quantification of collagen and progesterone (P4) levels were measured 5 days after AI (D5). The PRE PRP group showed less IUF accumulation than the CT group at T6, but all groups exhibited no IUF between T24 and T48. Other parameters did not differ significantly between groups. Cytological analysis revealed a high percentage of inflammatory cells at T6 in all groups, decreasing in subsequent evaluations. For the CT group, the percentage of neutrophils was similar to PT at T24, whereas the other groups reached this similarity only by T48. Histopathological evaluation showed marked neutrophilic and eosinophilic infiltration in all groups, indicating incomplete resolution of inflammation. In phase 2, fertility rates at 14 days post AI (D14) did not significantly differ between groups (CT: 0%, PRE PRP: 0% and PRE+POST PRP: 10%). In conclusion, PRP treatments were ineffective in modulating the uterine inflammatory response and did not enhance fertility in jennies inseminated with frozen donkey semen.

Keywords: Endometritis; Asinus; Fertility; Frozen semen; Platelet concentrate.

1. INTRODUÇÃO

A endometrite pós-cobertura, embora seja um mecanismo fisiológico transitório do sistema reprodutor feminino, pode se tornar persistente, conhecida como endometrite persistente pós-cobertura (EPPC), afetando a capacidade de concepção do sêmen ou a sobrevivência embrionária, devido a um ambiente uterino impróprio (WATSON, 2000a; TROEDSSON et al., 2001; LE BLANC & CAUSEY, 2009; KATILA, 2012). Este processo é mais frequente em fêmeas equídeas inseminadas com sêmen criopreservado em comparação ao sêmen fresco e refrigerado, devido à maior imunogenicidade ocasionada por componentes alergênicos nos diluentes de congelação, como os crioprotetores, e pela ausência de plasma seminal (KOTILAINEN et al., 1994; WATSON, 2000b; TROEDSSON et al., 2001; FIALA et al., 2007; KATILA, 2012; CAZALES et al., 2018). Além disso, fatores relacionados ao sistema reprodutor feminino que prejudicam a depuração mecânica e a resposta imune podem facilitar a persistência da inflamação, como uma conformação vulvar inadequada, maior inclinação vestibulo-vaginal, incompetência cervical, contratilidade uterina deficiente, dentre outros (TROEDSSON, 1999; MAISCHBERGER et al., 2008; LE BLANC & CAUSEY, 2009; WOODWARD et al., 2012; WOODWARD et al., 2013; MORRIS et al., 2020).

Já foi demonstrado que a resposta inflamatória uterina após inseminação artificial com sêmen criopreservado é mais intensa e prolongada em jumentas do que em éguas (COSTA et al., 2023), o que pode explicar as diferentes taxas de fertilidade entre essas duas espécies quando inseminadas com sêmen asinino criopreservado (0-28% em jumentas versus 36-54,55% em éguas) (TRIMECHE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006; VIDAMENT et al., 2009; CANISSO et al., 2011; DIAZ-JIMENEZ et al., 2021; COSTA et al., 2023). Esses resultados limitam o uso comercial de sêmen congelado, a dispersão de material genético e a conservação de material genético dessa espécie, o que é preocupante dada a atual redução da população de asininos em nível global, devido ao abate clandestino indiscriminado, dado ao interesse comercial por sua pele e subprodutos, e à substituição desses animais por máquinas em atividades agrícolas (KUGLER et al., 2008; CARNEIRO et al., 2018).

Diante desse contexto, estratégias e terapias para reduzir a resposta inflamatória uterina após inseminação artificial com sêmen congelado poderiam melhorar os índices de fertilidade em jumentas, contribuindo para resolver esse desafio na reprodução desses animais. ROTA et al. (2012) demonstraram isso ao alcançarem taxas de fertilidade satisfatórias em jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado (61,5%), empregando uma abordagem que envolveu a adição de plasma seminal ao sêmen descongelado, seguida de lavagens uterinas pós-

inseminação. No entanto, esses resultados não foram consistentemente replicados por outros grupos de pesquisa.

O Plasma Rico em Plaquetas (PRP) é uma terapia conhecida por suas propriedades imunomoduladoras, analgésicas, anti-inflamatórias e de estímulo à cicatrização e regeneração tecidual (MARX, 2001; ANITUA et al., 2004; MARX, 2004; ALVES & GRIMALT, 2017). Em estudos com equinos, o PRP demonstrou regular negativamente os transcritos endometriais para as interleucinas inflamatórias IL-1 β , IL-6 e CXCL-8 (METCALF et al., 2012 e SEGABINAZZI et al., 2017), resultando em redução de PMNs (REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2017; SEGABINAZZI et al., 2021; ANDINO et al., 2023) e de líquido intrauterino pós inseminação artificial (METCALF, 2014; REGHINI et al., 2016; SEGABINAZZI et al., 2021), incremento das taxas de fertilidade (METCALF, 2014; SEGABINAZZI et al., 2017) e da porcentagem de embriões recuperados por lavagem e por número de ovulações (SEGABINAZZI et al., 2021).

Na espécie asinina, FANTINI et al. (2021) obtiveram sucesso no tratamento de duas jumentas diagnosticadas com endometrite crônica (classificadas como 2B na classificação histológica endometrial de Kenney e Doig de 1986) e inférteis nos últimos dois anos, empregando uma única infusão intrauterina de 20 mL de PRP, o que resultou em diagnósticos positivos de gestação no ciclo estral subsequente dessas fêmeas. De forma similar, FARGHALI et al. (2022) demonstraram que duas infusões intrauterinas de PRP autólogo durante o diestro com intervalo de 7 dias, restauraram a aparência normal do endométrio de jumentas com endometrite bacteriana aguda, reduziram a inflamação e os isolados bacterianos. No entanto, o efeito do PRP em endometrite persistente pós-cobertura em jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado ainda não foi demonstrado.

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da infusão intrauterina de PRP como uma potencial terapia para modular a resposta inflamatória e melhorar as taxas de fertilidade em jumentas inseminadas com sêmen asinino criopreservado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aspectos éticos do estudo

O estudo foi conduzido de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Produção da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV), conforme protocolo 25/2021.

2.2. Animais e local de pesquisa

A pesquisa foi realizada na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, *campus* Viçosa - MG (Latitude 20° 44' 58" S e Longitude 42° 51' 10" O), durante o ano de 2023.

Foram selecionadas para o estudo 11 fêmeas, idade entre 5 e 15 anos, com citologia uterina negativa durante o estro (<5% de PMN), conforme descrito por BROOK, 1993) e ausência de líquido intrauterino. As onze jumentas participaram de duas fases experimentais, porém um animal foi excluído do experimento durante a fase 2. Os animais foram mantidos a pasto (capim *Paspalum notatum*) sob luz natural e receberam ração balanceada, capim picado (*Pennisetum purpureum* cv. Cameron), água e sal mineral *ad libitum*.

2.3. Delineamento experimental

Foram utilizados 65 ciclos estrais, 6 ciclos de cada jumenta, para avaliação dos grupos controle (CT, n=22) e dos grupos com tratamento local com PRP PRÉ (tratamento antes da IA, n=22) e PRP PRÉ+PÓS (tratamento antes e após a IA, n=22), como esquematizado abaixo (Figura 1). Assim, cada jumenta contribuiu com dois ciclos estrais para cada grupo avaliado, sendo que um dos ciclos foi utilizado para avaliações focadas na resposta inflamatória uterina (fase experimental 1) e o outro ciclo estral foi utilizado para avaliação da fertilidade (fase experimental 2).

Portanto, foi realizado um estudo em delineamento do tipo crossover, em que todas as jumentas passaram por todos os tratamentos avaliados. A ordem dos tratamentos avaliados por ciclo estral de cada fêmea, foi designada de forma randômica.

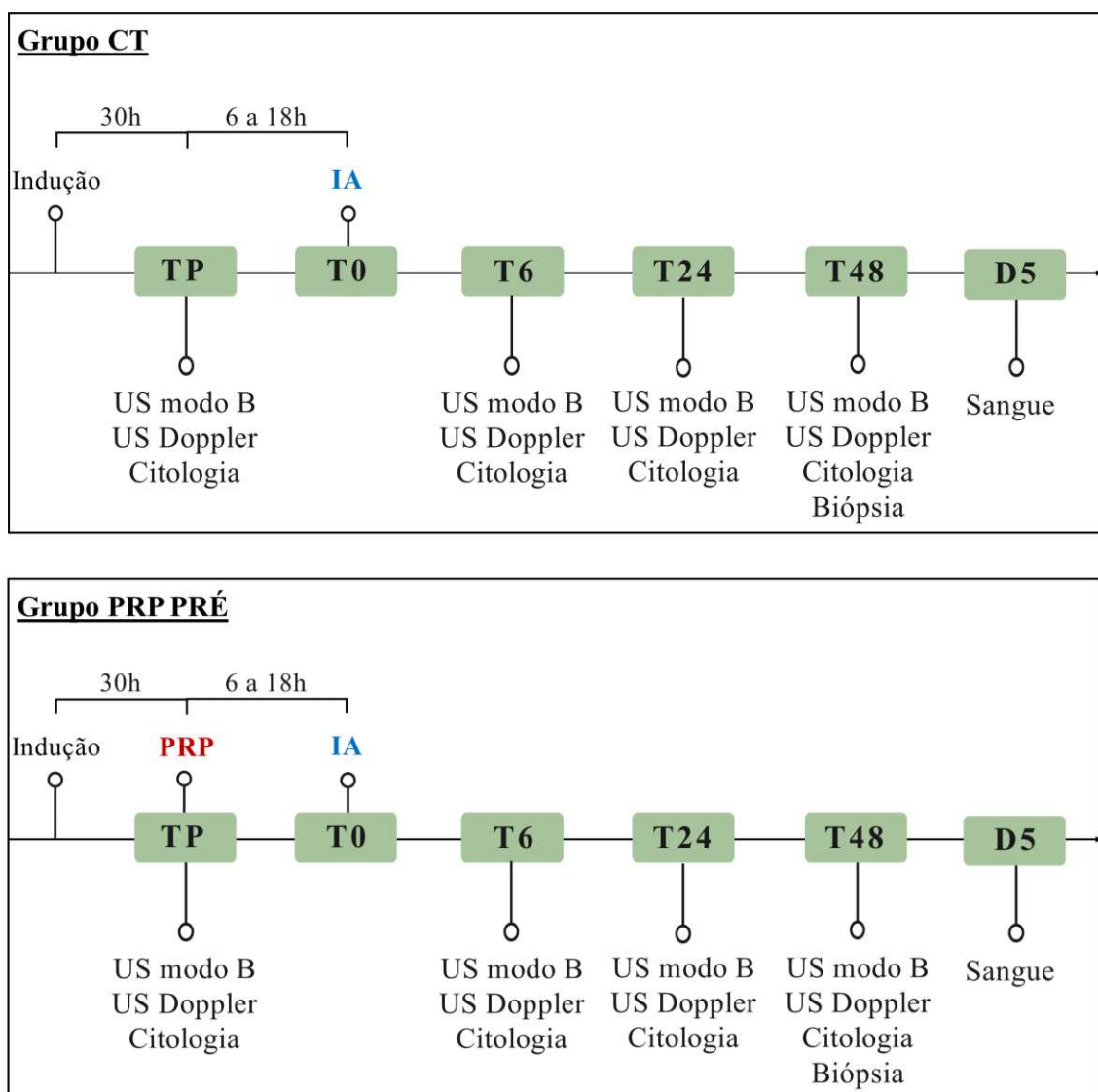
Grupos de cada fase experimental

- ✓ **CT (Controle):** Sem tratamento com PRP.
- ✓ **PRP PRÉ (PRP antes da IA):** Infusão de PRP 30h após a indução da ovulação (6 a 18h antes da IA).
- ✓ **PRP PRÉ+PÓS (PRP antes e após a IA):** Primeira infusão de PRP 30h após a indução da ovulação (6 a 18h antes da IA) e segunda infusão de PRP 4h após a IA.

Fase experimental I

Foram utilizados 33 ciclos estrais, sendo 3 de cada fêmea asinina para cada protocolo de tratamento avaliado, além do ciclo controle: grupo CT (n=11), grupos PRP PRÉ (n=11) e PRP PRÉ+PÓS (n=11).

Em cada ciclo, a inseminação artificial (IA) com sêmen asinino criopreservado foi realizada imediatamente após detecção da ovulação (T0). Realizou-se avaliações de ultrassonografia (modo B e modo Doppler) e citologia uterina nos tempos TP (30h após a indução da ovulação, previamente à IA e ao tratamento com PRP), T6 (6 horas após IA), T24 (24 horas após IA) e T48 (48 horas após IA) e biópsia uterina no tempo T48. Além disso, 5 dias após a ovulação (D5), o sangue foi coletado para dosagem de progesterona sérica e foi administrado 5 mg de Lutalyse® (Dinoprost Trometamina 5 mg/mL, Zoetis®, SP/Brasil), via intramuscular, para induzir a luteólise (Figura 3).



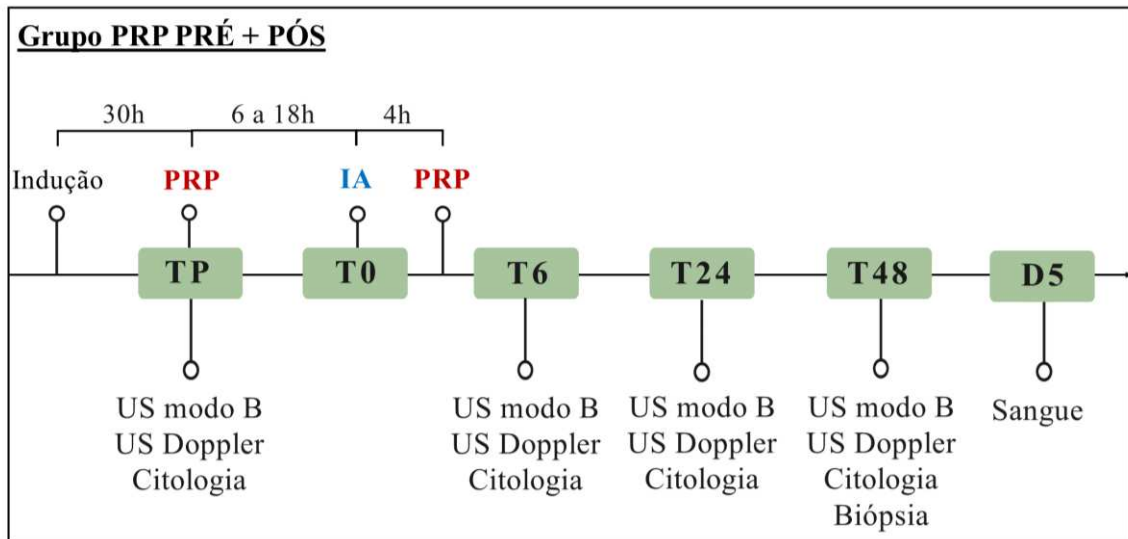
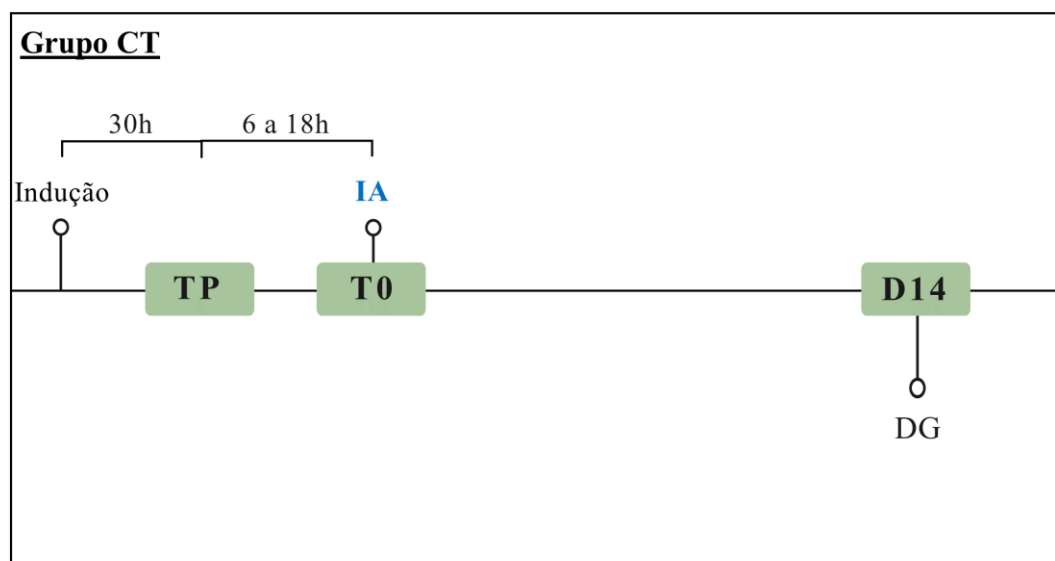


Figura 3. Delineamento da fase experimental 1. TP: momento prévio à IA e ao tratamento com PRP. T0: momento da IA. T6: 6 horas após IA. T24: 24 horas após IA. T48: 48 horas após IA. D5: 5 dias após a IA. PRP: plasma rico em plaquetas. IA: inseminação artificial. US: ultrassonografia.

Fase experimental II

Foram utilizados 32 ciclos estrais de um total de 11 jumentas. O grupo CT (n=11) foi atribuído ao controle e os grupos PRP PRÉ (n=11) e PRP PRÉ+PÓS (n=10) apresentaram tratamento local com PRP. Em cada ciclo, realizou-se a inseminação artificial (IA) com sêmen asinino criopreservado imediatamente após detecção da ovulação (T0) e o diagnóstico de gestação foi realizado aos 14 dias após a ovulação (D14), utilizando US modo B (Figura 4).



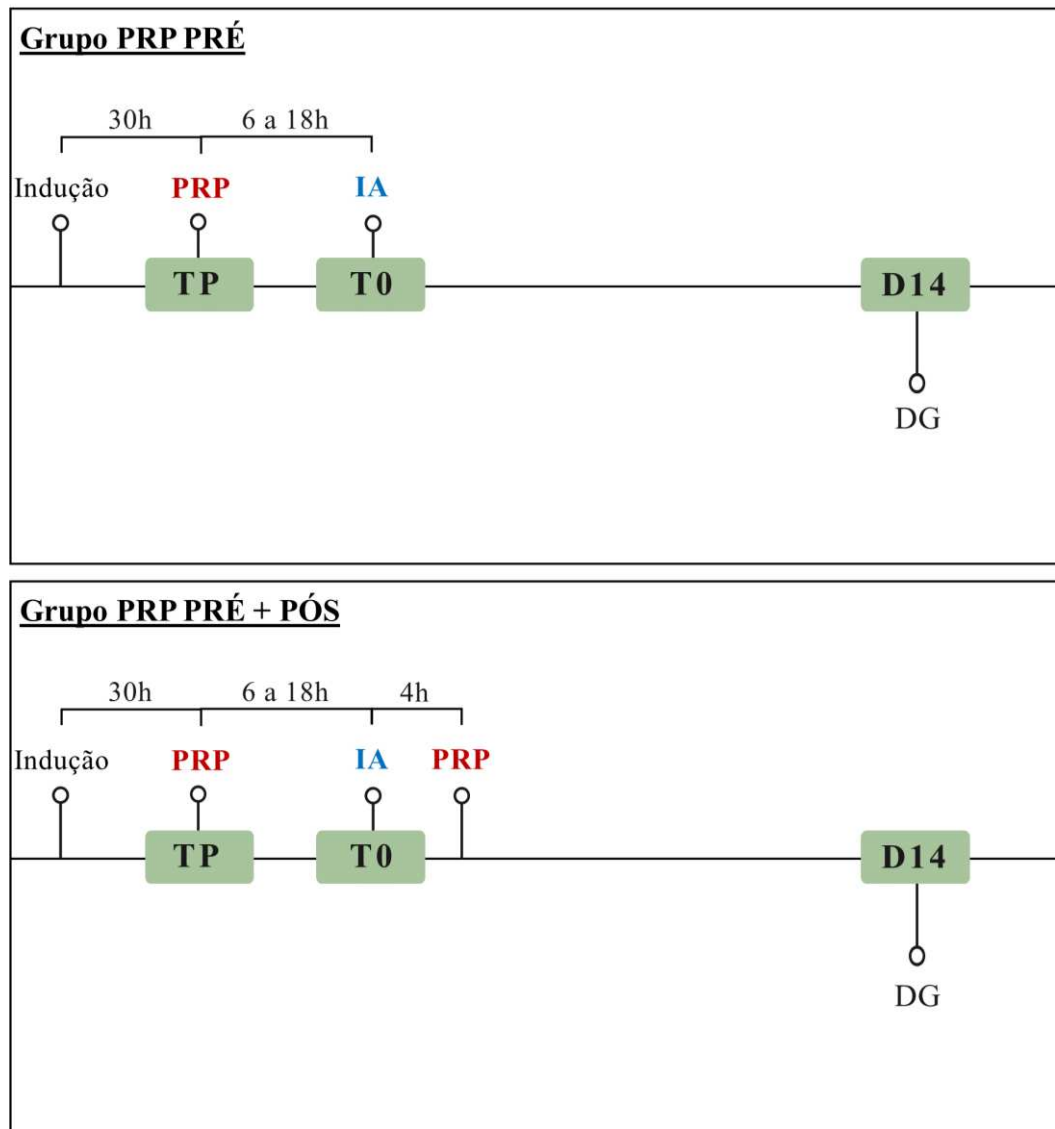


Figura 4. Delineamento da fase experimental 2. TP: momento prévio à IA e ao tratamento com PRP. T0: momento da IA. D14: 14 dias após a IA. PRP: plasma rico em plaquetas. IA: inseminação artificial. DG: Diagnóstico de gestação.

2.4. Congelamento do sêmen

Posteriormente à estabilização das reservas extra gonadais, iniciaram-se as coletas das amostras seminais utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil). Após estimulação dos machos pela presença de jumentas em cio, foi realizada a coleta em manequim artificial. Posteriormente, o sêmen foi filtrado em filtro de Nylon para remoção da fração gel e sujidades. Apenas ejaculados que apresentaram motilidade total $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 foram utilizados.

O sêmen avaliado foi diluído na proporção 1:1 em diluente comercial a base de leite desnatado Botu-sêmen[®] (Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil) e centrifugado a $600\times g$ por 10

minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de espermatozoides ressuspense em diluente comercial a base de gema de ovo Botu-Crio[®] (Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil), obtendo concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL. As amostras ressuspendidas foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, contendo 100×10^6 espermatozoides por palheta, e resfriadas à 5° C por 20 minutos em geladeira automática digital (Minitub[®], Porto Alegre/RS, Brasil), iniciando-se assim a fase de estabilização da curva de congelamento. Após o resfriamento e utilizando uma caixa isotérmica preenchida com nitrogênio líquido (N₂), as palhetas inicialmente tiveram contato com o vapor do nitrogênio por 20 minutos e, posteriormente, foram imersas em nitrogênio e armazenadas em botijões criogênicos (PAPA et al., 2008).

2.5. Controle do ciclo estral e inseminação artificial

As jumentas foram examinadas diariamente por palpação transretal e ultrassonografia (Ultrassom modelo Z5VET Mindray[®], China) para acompanhamento do ciclo estral por meio da avaliação do tônus uterino, abertura de cérvix, edema endometrial, presença de corpo lúteo e presença e tamanho de folículos. Além disso, a apresentação de sinais característicos de cio, como micção frequente, inquietude, mastigação, montagem sobre outras jumentas, imobilização na presença do macho e orelhas caídas, foram observados.

A partir destas avaliações, em cada ciclo estral quando um folículo ≥ 29 mm de diâmetro era identificado, em associação à presença de edema uterina e à demonstração de sinais de cio, realizou-se a indução da ovulação com aplicação intramuscular (IM) de 250 μ g de Strelin[®] (Histrelina 250 μ g/mL, Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil), conforme OLIVEIRA et al. (2019). Após 30 horas do momento da indução, as jumentas foram examinadas a cada 6 horas até detecção da ovulação ou até completar 48 horas da indução. Assim, ciclos em que os animais ovularam antes ou depois do intervalo estipulado (antes de 30h e após 48h da indução) foram excluídos e o ciclo seguinte foi utilizado.

A inseminação artificial com sêmen congelado foi realizada quando identificada a ovulação, mediante palpação e ultrassonografia transretal, utilizando-se dose inseminante de 1 bilhão de espermatozoides, conforme descrito por OLIVEIRA et al. (2016). Para isso, 10 palhetas (3 palhetas de cada um dos 3 jumentos e 1 palheta aleatória) foram descongeladas em banho-maria à 37°C por 30 segundos, conforme ROTA et al. (2012). O sêmen descongelado, apresentando motilidade total $\geq 30\%$ e vigor ≥ 2 , era depositado no corno uterino ipsilateral à ovulação, utilizando uma pipeta flexível de ponta romba (Minitube[®], Porto Alegre/RS, Brasil).

2.6. Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP)

O protocolo utilizado para obtenção do PRP foi o método descrito por FARGHALI (2022) modificado. Para cada infusão com PRP, 60 mL de sangue foi coletado da veia jugular externa da fêmea asinina, acondicionado em tubos tipo falcon contendo 3,2% de citrato de sódio e submetido à primeira centrifugação a 250×g por 10 minutos. Logo após a separação do plasma sanguíneo, o mesmo foi acondicionado em tubos tipo falcon sem anticoagulante e centrifugados pela segunda vez a 2.000×g por 10 minutos. Posteriormente, 2/3 do sobrenadante da superfície foi descartado e o 1/3 final foi considerado PRP. A contagem das plaquetas foi feita pelo método manual, através Câmara de Neubauer, preenchida com uma amostra do PRP diluída em solução Rees-Ecker (diluição 1:50) e colocada previamente em câmara úmida por 20 minutos para sedimentação antes da contagem.

Cada tratamento local foi realizado utilizando 10 mL de PRP, contendo concentração plaquetária mínima de 700×10^3 plaquetas/ μL , depositado no corpo uterino com o auxílio de pipeta de inseminação convencional (TNB Brasil[®], Garça/SP, Brasil) coberta com uma camisinha sanitária plástica estéril (IMV Technologies[®], Campinas/SP, Brasil). O momento da administração do PRP diferiu entre os tratamentos, ocorrendo uma ou duas infusões intrauterinas, antes ou antes e após a inseminação artificial, como demonstrado no item anterior.

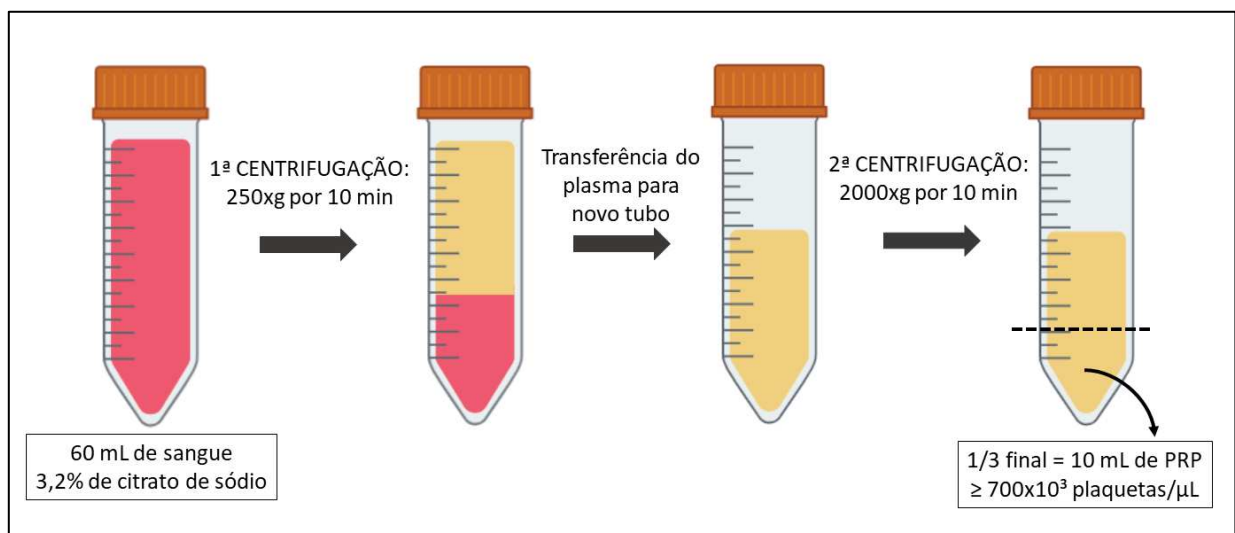


Figura 5. Protocolo para preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) utilizado no presente estudo.

2.7. Avaliações

2.7.1. Edema endometrial, líquido intrauterino e perfusão sanguínea uterina

As avaliações ultrassonográficas foram realizadas nos tempos P, T6, T24 e T48 durante os grupos da fase 1, como mencionado anteriormente, utilizando aparelho modelo Z5VET[®]

(Mindray Medical International Limited, China) equipado com transdutor linear de (6 - 8 MHz) e Doppler (modos colorido e espectral). As imagens em escala de cinza foram produzidas em frequência de 7,5 MHz com ganho de 90% e as imagens em modo colorido em frequência de 5,7 MHz com ganho de 70% e frequência de repetição de pulso de 0,7 kHz.

Após a palpação transretal para identificação das estruturas do aparelho reprodutor, realizou-se a avaliação ultrassonográfica em modo B. Nesta avaliação, identificava-se, de forma subjetiva, a presença de edema endometrial, classificado de 0 a 4 – sendo grau 0 considerado sem edema, 1 edema discreto, 2 edema moderado, 3 edema abundante e 4 edema exacerbado – e a presença de fluido no lúmen uterino classificado em ausente (grau 0), escasso (grau 1), moderado (grau 2) e abundante (grau 3) (GINTHER, 1992; GASTAL e GINTHER, 1998).

O modo Doppler colorido foi utilizado para avaliação da perfusão vascular do endométrio, realizada de forma objetiva (SILVA e GINTHER, 2006), através da obtenção de dois vídeos de cada região do útero (corpo, corno direito e corno esquerdo). De cada vídeo, foi extraída uma imagem que apresentasse maior vascularização através do programa Adobe Premier Pro CC 2022 (Adobe Systems®, San Jose, CA). As imagens extraídas foram posteriormente processadas no programa Adobe Photoshop CC 2022 (Adobe Systems®, San Jose, CA) para obtenção da área total da região uterina (pixels em escala de cinza + pixels coloridos das secções uterinas avaliadas), área de pixels coloridos e, posteriormente, a relação da porcentagem de pixels em relação à área total da secção, utilizada como indicador da vascularização uterina.

2.7.2. Citologia esfoliativa endometrial

As coletas de material para avaliação citológica endometrial foram realizadas nos tempos P, T6, T24 e T48 durante os grupos da fase 1, como demonstrado anteriormente. Para a coleta das amostras, foi utilizada uma escova ginecológica descartável e estéril (ABSORVE, CRAL®, São Paulo/SP, Brasil), duplamente protegida por uma pipeta estéril e uma camisinha sanitária plástica estéril (IMV Technologies®, Campinas/SP, Brasil).

As lâminas foram preparadas após a coleta, secas ao ar e coradas com kit Panótico Rápido (Laborclin®, Rio de Janeiro/RJ, Brasil). As lâminas foram montadas em Entellan® e a leitura foi realizada através de um microscópio óptico de luz em aumento de 400x, através da contagem de 200 células totais, gerando uma porcentagem de cada tipo celular e a porcentagem de células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e basófilos) em relação às células endometriais (REGHINI, 2013). Seguiu-se a classificação do grau de inflamação de

acordo com BROOK (1993): inflamação ausente (<5%), inflamação leve (5 a 15%), inflamação moderada (15 a 30%) e inflamação grave ($\geq 30\%$).

2.7.3. Biópsia endometrial para histopatologia e quantificação de colágeno

A coleta de material para avaliação de histopatologia e quantificação de colágeno foi realizada no tempo T48 em todos os grupos da fase 1. Uma pinça de biópsia (Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil), coberta com uma camisinha sanitária plástica (IMV Technologies[®], Campinas/SP, Brasil) foi introduzida no lúmen uterino para coletar um pequeno fragmento do endométrio da região do corpo, o qual foi acondicionado em solução de formalina tamponada à 10% por 24 horas para fixação e posteriormente armazenado em álcool 70%. Posteriormente, as amostras foram seccionadas em cortes histológicos de 5 μm de espessura, distribuídas em lâminas e coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) para avaliação histopatológica e Picro Sirius Red (PSR) para a identificação e quantificação do colágeno. A avaliação das lâminas foi realizada às cegas quanto a identidade das amostras e a natureza dos grupos por um técnico experiente.

As lâminas de histopatologia foram avaliadas em microscópio de luz (400 \times) para avaliação geral do tecido uterino, através da observação das alterações inflamatórias e determinação do grau de fibrose. Os neutrófilos foram avaliados em cinco campos de cada estrato (compacto e esponjoso), escolhidos aleatoriamente para contagem dos mesmos. A avaliação do infiltrado de eosinófilos e linfócitos foi realizada através da classificação da de cada célula em escore, variando de 0 a 4, sendo 0 ausência, 1 discreto, 2 discreto a moderado, 3 moderado e 4 severo (PIMENTEL et al., 1989).

Para determinação do grau de fibrose, as lâminas histopatológicas foram analisadas de maneira cega pelo histopatologista, observando o processo degenerativo e classificadas em quatro graus: Grau 1, sem fibrose periglandular ou ninhos; Grau 2, leve endometrose com fibrose periglandular difusa, com 1-3 camadas, >2 ninhos por campo e poucas lacunas linfáticas; Grau 3, fibrose periglandular difusa com 5-10 camadas, 2-4 ninhos por campo e presença ocasional de lacunas linfáticas; Grau 4, endometrose grave apresentando fibrose periglandular difusa com 10 ou mais camadas, com >4 ninhos e muitas lacunas linfáticas, conforme descrito por KENNEY & DOIG (1986), modificado por SCHOON et al. (1992).

Para a quantificação do colágeno, cinco imagens digitais de cada amostra foram capturadas em alta resolução (5.0 megapixels) com auxílio do microscópio óptico (Leipzig) conectado a câmera digital com conexão USB Moticam com sensores CMOS processado pelo software Motic images plus 2.0 em magnificação 100 \times . As imagens capturadas e utilizadas no

estudo foram realizadas de forma aleatória e sem sobreposição. Em seguida, a técnica de análise e quantificação morfométrica das imagens digitais coradas com PSR foi realizada através do software ImageJ 1.52 em quatro etapas bem definidas: ajuste das imagens de pixel para micrometros, conversão para a grayscale, delimitação do colágeno corado em vermelho usando o ícone Threshold e por fim, quantificação da área determinada pelo Threshold. Com as imagens já calibradas em micrômetros, o comando RGB Stack foi utilizado para dividir as imagens em canais vermelho, verde e azul. No entanto, todas as análises foram realizadas no canal verde, pois apresentou o melhor contraste para as avaliações. Desta forma, a partir da ferramenta Threshold, realizou-se a delimitação da área de colágeno e mensuração desta área em razão da área total da imagem, obtendo a porcentagem da área de colágeno (CENTENO, 2019).

2.7.4. Concentração de progesterona

Cinco dias após a ovulação/inseminação artificial (D5) em todos os grupos da fase 1, 10 mL de sangue foram coletados da veia jugular em tubos não heparinizados utilizando agulha para coleta múltipla de sangue a vácuo. O sangue coletado foi centrifugado em 2.200×g por 10 minutos e o soro foi armazenado em tubos de 1,5 mL a -20°C até avaliação.

A concentração sérica de P4 foi determinada por radioimunoensaio, usando um kit comercial RIA de progesterona (Beckman Coulter do Brasil, São Paulo/SP, Brasil) no Laboratório de Endocrinologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Brasília/DF, Brasil), seguindo os procedimentos descritos por VIANA et al. (2013). Os coeficientes de variação intraensaio e interensaio foram de 6,4% e 2,3%, respectivamente, e a sensibilidade foi de 0,04 ng/mL.

2.7.5. Diagnóstico de gestação

Durante a fase 2, a ultrassonografia também foi utilizada para diagnóstico de gestação (DG) aos 14 dias após a ovulação para obtenção da taxa de fertilidade. O diagnóstico foi considerado positivo ao visualizar a vesícula embrionária após escaneamento de toda extensão uterina. Caso o resultado no D14 fosse negativo, repetia-se a avaliação após dois dias (D16) para confirmação. Após o exame, foi administrado 5 mg de Lutalyse® (Dinoprost Trometamina 5 mg/mL, Zoetis®, SP/Brasil), via intramuscular, para promover a luteólise, reiniciando a fase do estro. O resultado da taxa de fertilidade foi obtido a partir da razão entre a quantidade de diagnósticos de gestação avaliados em positivos com o número de ciclos realizados em cada grupo.

2.8. Análises estatísticas

Distribuição normal dos dados foi determinada com o teste de Shapiro-wilk. Dados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em escala logarítmica (Log10). Uma análise de inferência para modelos mistos lineares generalizados (GLMMs) (Proc Glimmix) foi utilizada para comparar a média entre os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS das variáveis: corno inseminado, corno não inseminado, corpo uterino, células inflamatórias e neutrófilos. As matrizes de covariância foram escolhidas a partir dos critérios de informação de AIC (Akaike's Information Criterion), AICC (Consistent Akaike's Information Criterion) e BIC (Bayesian Information Criterion). Como efeitos fixos foram considerados o grupo (G), tempo (T) e a sua interação (G*T). O comando PDIFF foi utilizado para comparar as médias ajustado com o teste post hoc de Tukey. As comparações entre as médias dos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS das variáveis neutrófilos no estrato compacto, área de colágeno e concentração de progesterona foram realizadas utilizando o teste ANOVA. Os resultados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM). Diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

As variáveis: líquido uterino, edema endometrial, eosinófilos, monócitos, linfócitos, basófilos, neutrófilos do estrato esponjoso e fibrose foram analisadas utilizando o teste não paramétrico de Friedman (comparação dentro do grupo ao longo do tempo) e Kruskal-Wallis (comparação entre os grupos no mesmo tempo). Os resultados são mostrados como mediana (Q1 e Q3). Diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0,05$.

A taxa de prenhez foi comparada entre os grupos utilizando o teste de qui-quadrado com ajuste de Fisher. Os resultados são mostrados em percentual. Diferença estatística significativa foi considerada quando $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o pacote SAS (<https://welcome.oda.sas.com/>) e GraphPad Prism Versão 9.3.0.

3. RESULTADOS

3.1. Edema endometrial e líquido intrauterino

Os resultados obtidos para a avaliação de edema endometrial estão descritos na Tabela 3. Os escores de edema endometrial não foram diferentes entre os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS em todos os tempos avaliados ($p > 0,05$). Porém, houveram diferenças significativas do parâmetro ao longo do tempo dentro de cada grupo. Os grupos CT e PRP PRÉ+PÓS apresentaram redução do edema a partir do tempo 24 em relação ao momento do pico

inflamatório (T6) ($p < 0,05$), passando de um edema moderado a um edema discreto-moderado. Já no grupo PRP PRÉ, a redução do edema em relação ao T6 ocorreu apenas no T48 ($p < 0,05$). Apesar disso, todos os tempos avaliados apresentaram valor de edema similar em relação ao tempo controle (TP) ($p > 0,05$).

Tabela 3. Medianas e intervalos interquartis dos escores de edema endometrial e de líquido intrauterino das jumentas, avaliados previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS.

Variável	Tempo	Grupo		
		CT	PRP PRÉ	PRP PRÉ+PÓS
Edema endometrial	TP	1.5 (1 - 1.5) ^{AB}	1.5 (1 - 2) ^{AB}	1.5 (1.5 - 2) ^{AB}
	T6	2 (1.5 - 3) ^A	2.5 (2 - 2.5) ^A	2 (2 - 3) ^A
	T24	1.5 (1 - 1.5) ^B	1.5 (1 - 1.5) ^{AB}	1.5 (1 - 1.5) ^B
	T48	1 (0.5 - 1) ^B	1 (1) ^B	1 (1 - 1.5) ^B
Líquido intrauterino	TP	0 (0) ^B	0 (0) ^B	0 (0) ^B
	T6	2 (1 - 2) ^{Aa}	1 (0.5 - 1) ^{Ab}	1 (1 - 2) ^{Aab}
	T24	0.5 (0 - 1) ^{AB}	0 (0 - 0.5) ^{AB}	0 (0 - 0.5) ^B
	T48	0 (0) ^B	0 (0) ^B	0 (0) ^B

Escores de edema – 0: ausente; 1: discreto; 2: moderado; 3: abundante; 4: exacerbado. Escores de LIU - 0: ausente; 1: escasso; 2: moderado; 4: abundante. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma linha ($p < 0,05$).

Em relação a classificação dos escores de líquido intrauterino (LIU), indicados na Tabela 3, todos os grupos iniciaram as avaliações no TP com escore nulo para LIU, indicando ausência do mesmo. No tempo subsequente (T6), momento do pico inflamatório, observou-se maior acúmulo de LIU no grupo CT (líquido moderado) em comparação ao grupo PRP PRÉ (líquido escasso) ($p < 0,05$) e o grupo PRP PRÉ+PÓS não diferiu dos demais grupos neste tempo de avaliação. Também não foram observadas diferenças entre CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS ($p > 0,05$) quanto ao LIU nos demais tempos avaliados.

Quando os grupos foram avaliados individualmente, comparando-se o escore de LIU entre os tempos dentro de cada tratamento, diferenças foram notadas. Após a IA e tratamento com PRP, o acúmulo de LIU aumentou para escasso (grupos PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS) e moderado (grupo CT) no T6 ($p < 0,005$) em relação ao TP. Entre 24 e 48 horas após a IA, o escore de LIU reduziu em todos os grupos até esse parâmetro não ser mais observado, se igualando a TP ($p > 0,05$). No entanto, no grupo PRP PRÉ+PÓS o LIU reduziu já no T24 e nos demais grupos (CT e PRP PRÉ) esse parâmetro só se igualou ao TP no T48.

3.2. Área total da região uterina e perfusão sanguínea uterina

A área total (mm^2) (escala de cinza) exibiu efeito do tempo para as regiões de corno inseminado ($p=0,041$) e corno não inseminado ($p=0,0458$). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre grupos (Figuras 6A, 6B e 6C) e entre tempos (Figuras 6D, 6E e 6F) para as avaliações de corpo uterino, corno inseminado e corno não inseminado.

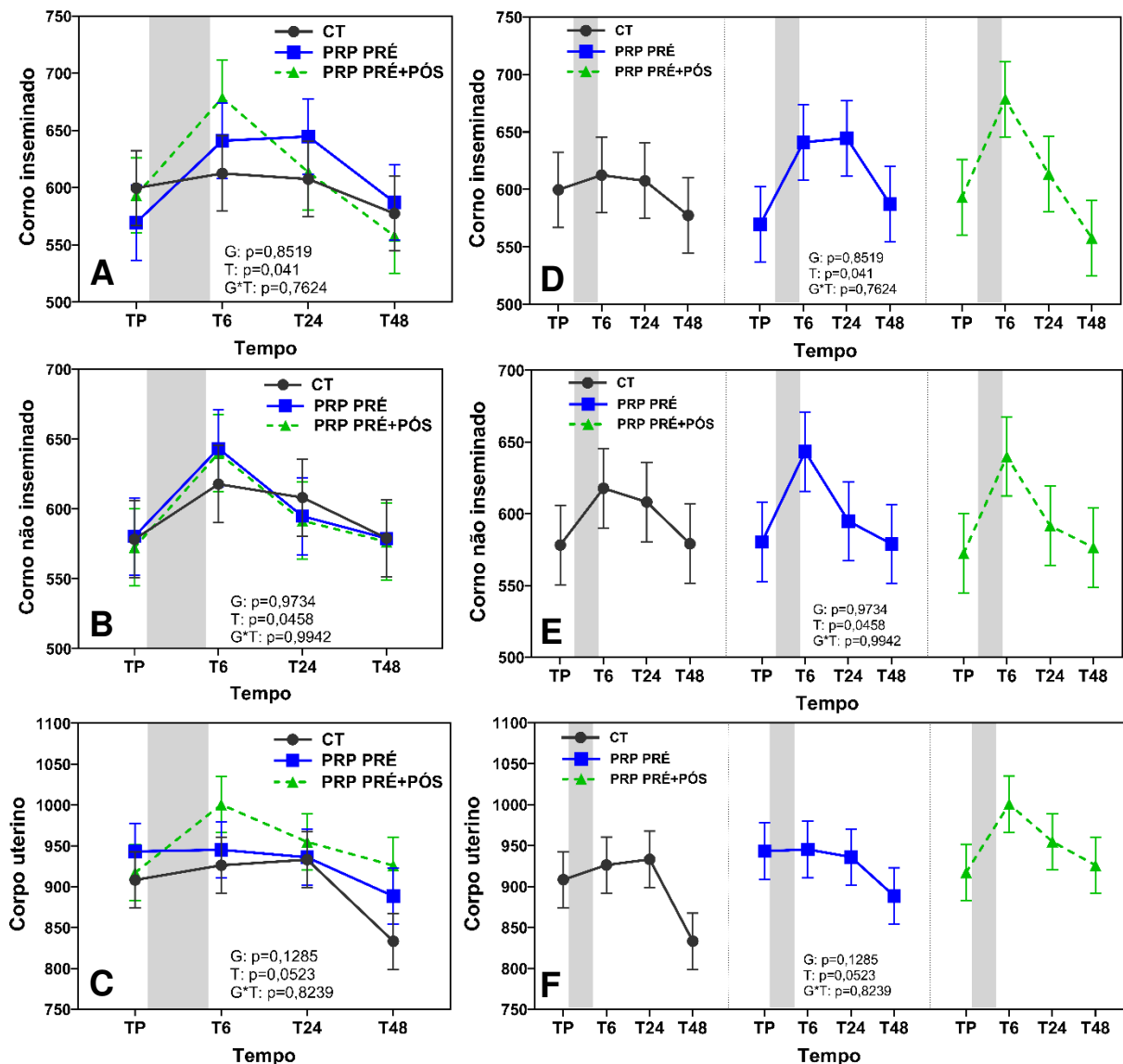


Figura 6. Médias e erros-padrão da área total (mm^2) (escala de cinza) avaliada previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS. Comparação entre grupos das regiões de corno inseminado (A), corno não inseminado (B) e corpo uterino (C). Comparação entre tempos dentro do mesmo grupo das regiões de corno inseminado (D), corno não inseminado (E) e corpo uterino (F). A faixa cinza indica o momento da IA. G: Grupo. T: Tempo.

Os resultados obtidos para a avaliação de porcentagem de pixels coloridos estão demonstrados na Figura 7. Este parâmetro apresentou efeito do tempo para as regiões de corno inseminado ($p<0,0001$), corno não inseminado ($p=0,0294$) e corpo uterino ($p<0,0001$). Não

foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$) nas avaliações de porcentagem de pixels coloridos no corpo uterino, corno inseminado e corno não inseminado na comparação entre os grupos (Figuras 7A, 7B e 7C).

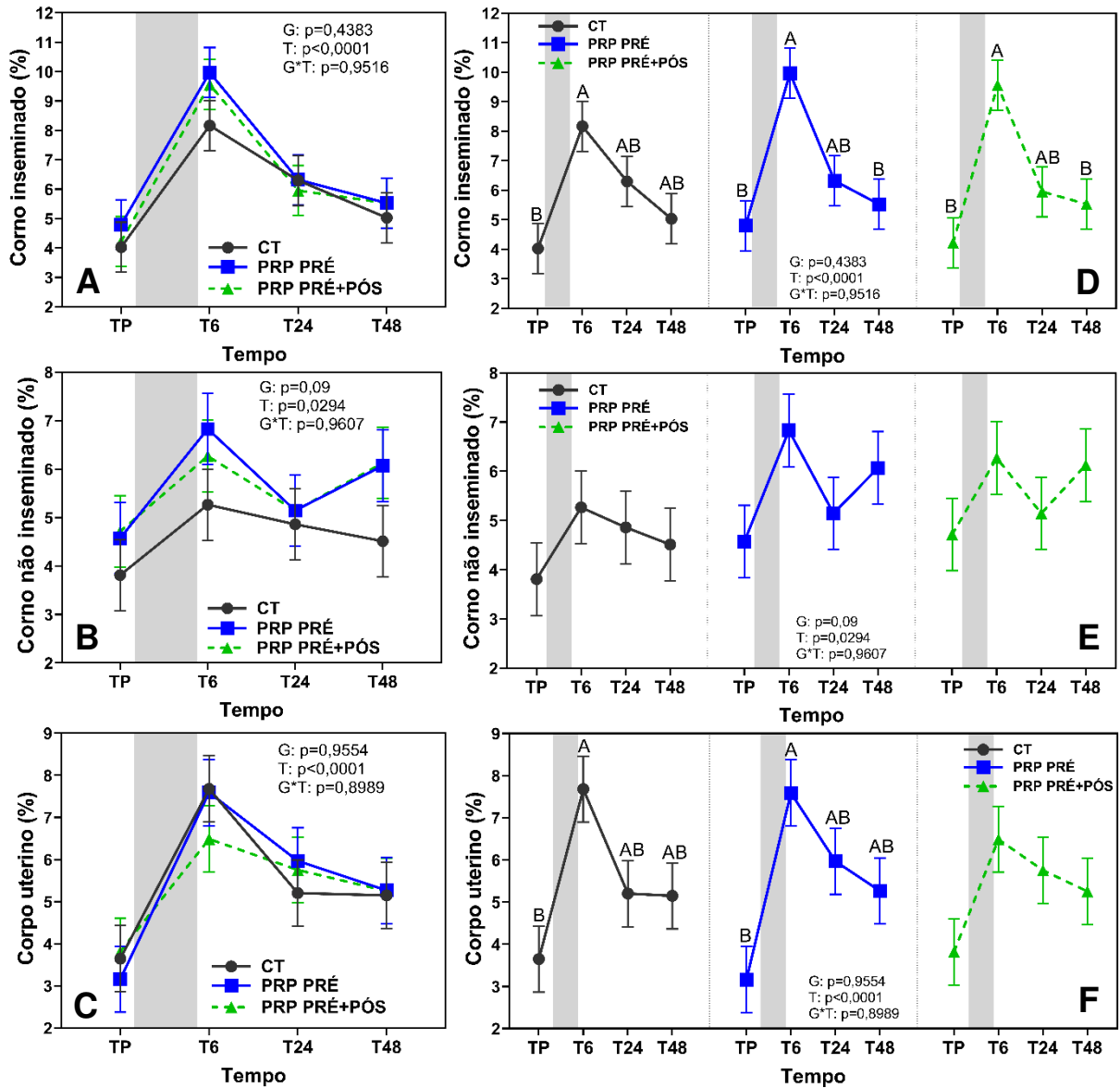


Figura 7. Médias e erros-padrão da porcentagem da área de pixels coloridos (vascularização) avaliada previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS. Comparação entre grupos das regiões de corno inseminado (A), corno não inseminado (B) e corpo uterino (C). Comparação entre tempos dentro do mesmo grupo das regiões de corno inseminado (D), corno não inseminado (E) e corpo uterino (F). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre tempos dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$). A faixa cinza indica o momento da IA. G: Grupo. T: Tempo.

A Figura 7D demonstra diferenças ao longo do tempo dentro de cada grupo no corno inseminado. A porcentagem de pixels coloridos aumentou no T6 em todos os grupos (CT: 8,17

$\pm 0,85\%$; PRP PRÉ: $9,96 \pm 0,85\%$; PRP PRÉ+PÓS: $9,56 \pm 0,85\%$) em relação ao tempo controle TP (CT: $4,02 \pm 0,85\%$; PRP PRÉ: $4,79 \pm 0,85\%$; PRP PRÉ+PÓS: $4,21 \pm 0,85\%$) ($p < 0,05$). No T48 a vascularização reduziu em relação ao tempo T6 nos dois grupos tratados com PRP, mas ainda permaneceu similar entre esses dois tempos no grupo CT, ainda que todos os grupos apresentassem valores similares de vascularização no T48 em relação ao TP (Figura 7D).

Na região corpo uterino também foram observadas diferenças ao longo do tempo nos os grupos CT e PRP PRÉ. Em ambos os grupos, maior porcentagem de pixels coloridos no T6 (CT: $7,68 \pm 0,78\%$; PRP PRÉ: $7,59 \pm 0,78\%$; PRP PRÉ+PÓS: $6,49 \pm 0,78\%$) foi observada em relação ao TP (CT: $3,64 \pm 0,78\%$; PRP PRÉ: $3,16 \pm 0,78\%$; PRP PRÉ+PÓS: $3,82 \pm 0,78\%$). Além disso, a perfusão sanguínea nos tempos 24 e 48 apresentaram valores similares ao T6 e ao TP ($p > 0,05$). Entretanto, não foram observadas diferenças ao longo do tempo no grupo PRP PRÉ+PÓS (Figura 7F).

No corno não inseminado não foram observadas diferenças entre os tempos de avaliação dentro de cada grupo ($p = 0,0294$) (Figura 7E).

3.3. Citologia esfoliativa endometrial

As porcentagens de células inflamatórias e neutrófilos exibiram efeito do tempo ($p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças quanto à porcentagem geral de células inflamatórias (Figura 8A), bem como quanto às porcentagens individuais dos perfis celulares (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos) (Figura 8B e Tabela 4) encontrados entre os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS ($p > 0,05$).

Os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS apresentaram no TP porcentagens de células inflamatórias similares ($1,97 \pm 3,45\%$, $2,79 \pm 3,6\%$ e $1,98 \pm 3,45\%$, respectivamente) ($p > 0,05$). No pico inflamatório (T6), observou-se aumento das células inflamatórias, atingindo inflamação severa em todos os grupos (CT: $63,57 \pm 3,45\%$; PRP PRÉ: $56,59 \pm 3,62\%$; PRP PRÉ+PÓS: $49,93 \pm 3,45\%$), em comparação ao TP ($p < 0,05$). Posteriormente, houve redução significativa desses valores nos tempos 24 (CT: $19,69 \pm 3,62\%$, PRP PRÉ: $22,27 \pm 3,45\%$ e PRP PRÉ+PÓS: $25,84 \pm 3,45\%$) e 48 (CT: $13,27 \pm 3,45\%$, PRP PRÉ: $11,49 \pm 3,45\%$ e PRP PRÉ+PÓS: $10,032 \pm 3,45\%$) ($p < 0,05$), sendo que o T48 apresentou valores similares ao TP ($p > 0,05$) em todos os grupos (Figura 8C).

Em relação ao comportamento do perfil de neutrófilos (Figura 8D), foi observada tendência de maior porcentagem desta célula no grupo CT em relação ao grupo PRP PRÉ+PÓS no T6 ($p = 0,0907$). Os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS apresentaram no tempo TP

porcentagens de neutrófilos similares ($1,56 \pm 3,19\%$, $2,35 \pm 3,35\%$ e $1,72 \pm 3,19\%$, respectivamente) ($p > 0,05$). Observou-se elevação do nível de neutrófilos no T6 (CT: $61,08 \pm 3,19\%$; PRP PRÉ: $51,99 \pm 3,35\%$; PRP PRÉ+PÓS: $47,01 \pm 3,19\%$) em comparação ao TP ($p < 0,05$), em todos os grupos, e redução significativa nos tempos 24 (CT: $16,58 \pm 3,35\%$, PRP PRÉ: $18,69 \pm 3,19\%$ e PRP PRÉ+PÓS: $22,35 \pm 3,19\%$) e 48 (CT: $11,38 \pm 3,19\%$, PRP PRÉ: $10,55 \pm 3,19\%$ e PRP PRÉ+PÓS: $9,22 \pm 3,19\%$) ($p < 0,05$). Porém, enquanto nos grupos PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS a porcentagem de neutrófilos apresentou valores similares ao TP somente no T48 ($p > 0,05$), no grupo CT esta similaridade já ocorreu no tempo 24.

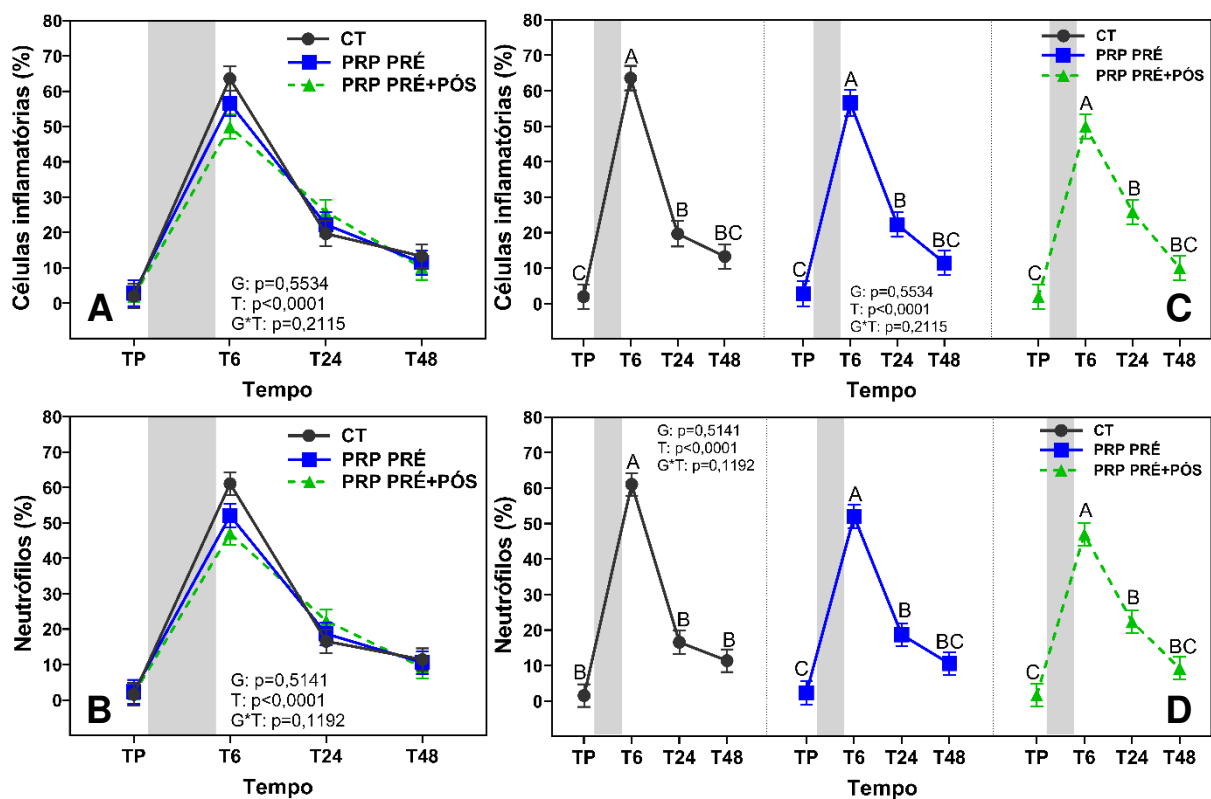


Figura 8. Médias e erros-padrão da porcentagem de células inflamatórias totais e neutrófilos avaliadas previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS. Comparação entre grupos da porcentagem de células inflamatórias totais (A) e neutrófilos (B). Comparação entre tempos dentro do mesmo grupo da porcentagem de células inflamatórias totais (C) e neutrófilos (D). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre tempos dentro do mesmo grupo ($p < 0,05$). A faixa cinza indica o momento da IA. G: Grupo. T: Tempo.

A Tabela 4 mostra o comportamento do perfil de eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos. A porcentagem de eosinófilos foi maior no T6 em relação ao TP ($p < 0,05$) no grupo PRP PRÉ e em relação aos tempos P e 48 ($p < 0,05$) no grupo PRP PRÉ+PÓS. No grupo CT não foram identificadas diferenças ao longo do tempo ($p > 0,05$).

A quantidade de monócitos apresentou diferença ao longo do tempo em todos os grupos. No CT, houve aumento de monócitos no T24 em relação ao TP. No grupo PRP PRÉ, a elevação da porcentagem de monócitos ocorreu no T6, mantendo até o T24, em comparação com os tempos P e 48 ($p < 0,05$). No grupo PRP PRÉ+PÓS, a elevação da porcentagem de monócitos também ocorreu no T6, mantendo-se superior ao TP até o T24 ($p < 0,05$). O grupo PRP PRÉ apresentou maior porcentagem de linfócitos no T24 em comparação ao TP ($p < 0,05$). As avaliações de basófilos não diferiram entre os grupos e também ao longo do tempo no mesmo grupo ($p > 0,05$).

Tabela 4. Medianas e intervalos interquartis da porcentagem de eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos em esfregaços de citologia uterina das jumentas, avaliadas previamente à IA e ao tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS.

Variável (%)	Tempo	Grupo		
		CT	PRP PRÉ	PRP PRÉ+PÓS
Eosinófilos	TP	0 (0 - 0.475)	0 (0) ^B	0 (0) ^B
	T6	0.455 (0 - 1.518)	0.5 (0 - 3.985) ^A	0.97 (0.47 - 2.44) ^A
	T24	0.485 (0 - 1.07)	0 (0 - 0.48) ^{AB}	0 (0 - 0.5) ^{AB}
	T48	0 (0 - 0.99)	0 (0 - 0.465) ^{AB}	0 (0) ^B
Monócitos	TP	0 (0) ^B	0 (0 - 0.47) ^B	0 (0 - 0.45) ^B
	T6	1.225 (0 - 1.858) ^{AB}	2.3 (1.445 - 3.055) ^A	0.97 (0.45 - 2.03) ^A
	T24	1.495 (0.735 - 2.353) ^A	2.45 (1.385 - 2.985) ^A	0.96 (0 - 5.91) ^A
	T48	0.975 (0.375 - 1.493) ^{AB}	0.45 (0 - 0.75) ^B	0.5 (0 - 0.93) ^{AB}
Linfócitos	TP	0 (0 - 0.125)	0 (0 - 0.465) ^B	0 (0)
	T6	0 (0 - 0.417)	0.5 (0 - 0.875) ^{AB}	0.45 (0 - 0.49)
	T24	0.24 (0 - 1.093)	0.94 (0.225 - 1.435) ^A	0.49 (0 - 1.74)
	T48	0.24 (0 - 1.11)	0 (0 - 0.725) ^{AB}	0 (0 - 0.47)
Basófilos	TP	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	T6	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	T24	0 (0 - 0,1225)	0 (0 - 0,225)	0 (0)
	T48	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística na mesma coluna ($p < 0,05$).

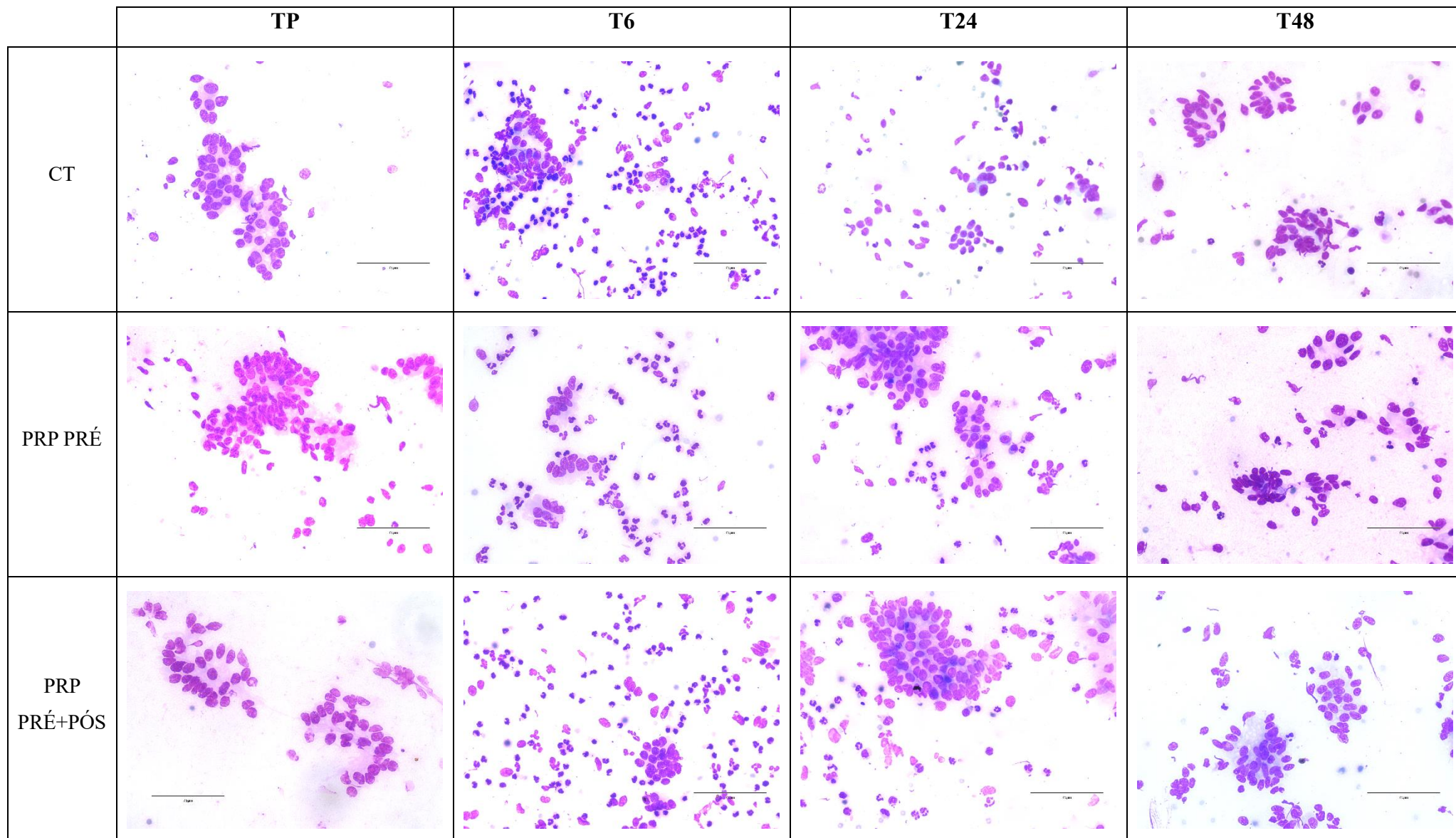


Figura 9. Comparação de imagens de citologia uterina de jumentas (aumento 400x) em coletas realizadas antes da IA e tratamento (TP) e após 6, 24 e 48 horas da IA com sêmen asinino congelado.

3.4. Histopatologia e quantificação de colágeno

Na avaliação histopatológica, realizada no T48 de cada grupo, obteve-se os resultados da contagem de neutrófilos nos estratos compacto (EC) e esponjoso (EE), escore de eosinófilos e linfócitos, grau de fibrose e porcentagem da área de colágeno das amostras (Figura 10).

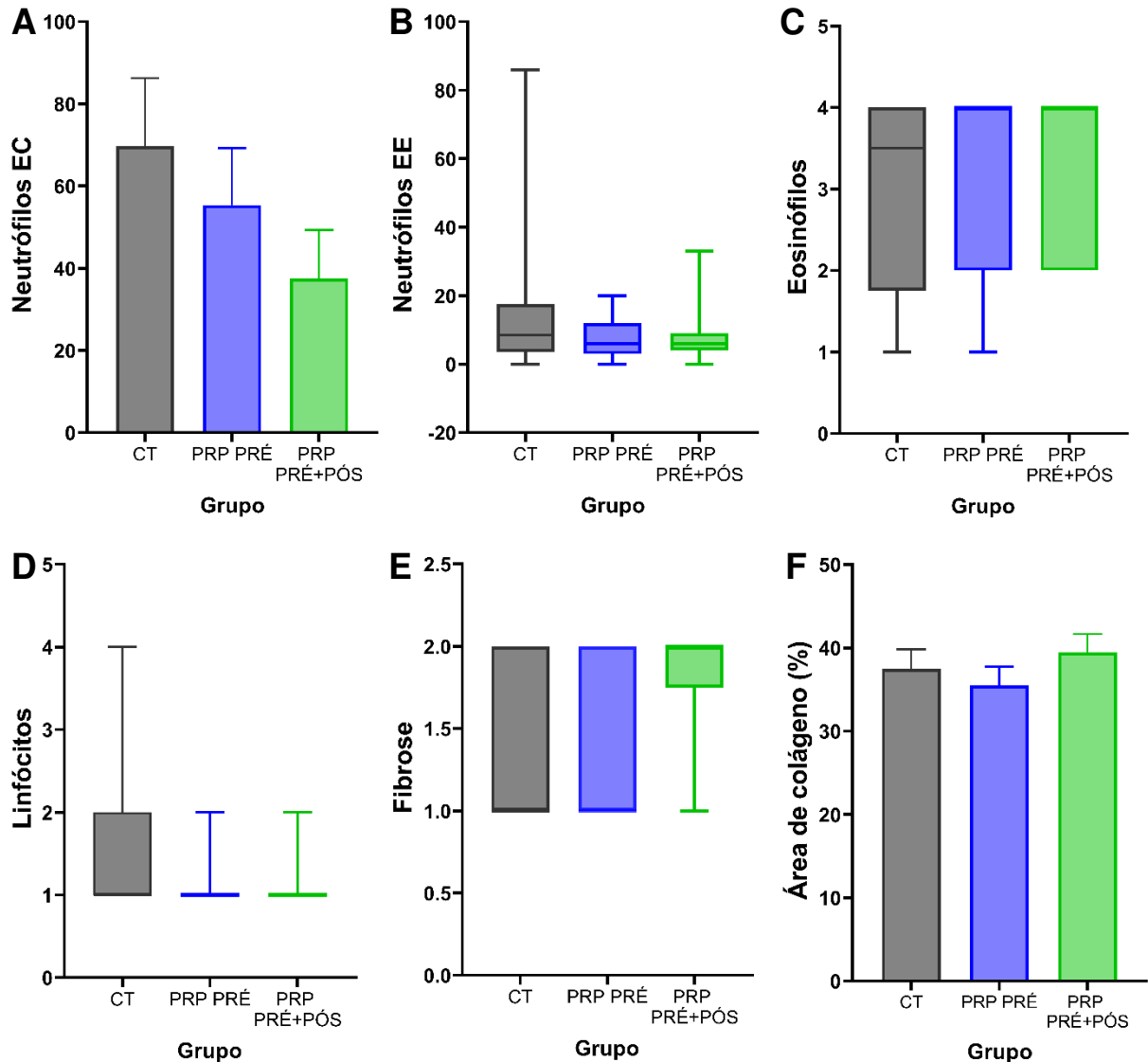


Figura 10. Médias e erros-padrão da contagem de neutrófilos no estrato compacto (A) e da porcentagem da área de colágeno (F) 48 horas após IA. Medianas e intervalos interquartílicos da contagem de neutrófilos no estrato esponjoso (B) e dos escores de eosinófilos (C), linfócitos (D) e fibrose (E) 48 horas após IA. EC: estrato compacto. EE: estrato esponjoso.

As médias das quantidades de neutrófilos contados no EC foram similares ($p > 0,05$) entre os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS ($69,7 \pm 16,59$, $55,36 \pm 13,91$ e $37,55 \pm 11,76$, respectivamente), conforme observado na Figura 10A. No EE, não foram encontradas diferenças ($p > 0,05$) entre as medianas das contagens de neutrófilos nos grupos CT, PRP PRÉ e

PRP PRÉ+PÓS, que corresponderam a 8,5 (3,5 – 17,5), 6 (3 - 12) e 6 (4 - 9), respectivamente (Figura 10B).

Em relação à avaliação em escores de eosinófilos e linfócitos também não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos para as variáveis ($p > 0,05$), como mostram as Figuras 10C e 10D, respectivamente. O grupo CT apresentou infiltrado de eosinófilos em grau de moderado a severo, escore 3,5 (1,75 – 4), e os grupos PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS foram avaliados com infiltrado em grau severo, escore 4 (2 – 4). A presença de linfócitos foi classificada em discreta em todos os grupos, apresentando escore 1 (1 – 2) para o grupo CT e escore 1 (1) para os grupos PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS.

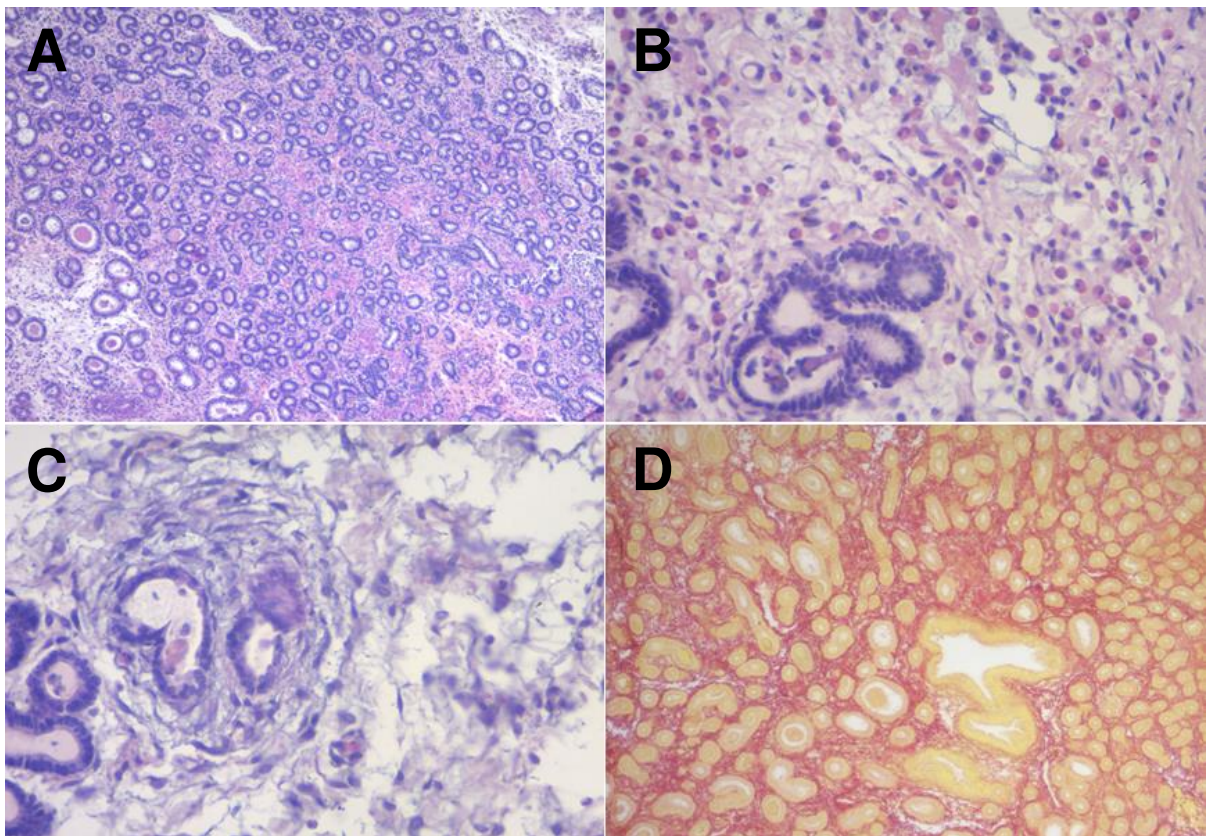


Figura 11. Endométrio de jumenta 48 horas após a IA. A: Endométrio praticamente sem alterações (100x). B: Infiltração de eosinófilos e neutrófilos severa no estrato compacto (400x). C: Presença de fibrose periglandular no estrato compacto (400x). D: Observa-se em amarelo as glândulas e em vermelho as fibras colágenas no estrato compacto (100x). Lâminas coradas com Hematoxilina Eosina (A, B e C) e Picro Sirius Red (D).

Os grupos CT e PRP PRÉ não apresentaram fibrose periglandular ou ninhos, correspondendo ao escore 1 (1 – 2), enquanto que o grupo PRP PRÉ+PÓS apresentou fibrose periglandular difusa com 1-3 camadas, <2 ninhos por campo e poucas lacunas linfáticas,

correspondendo ao escore 2 (1,75 – 2). Apesar disto, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($p>0,05$) (Figura 10E).

A porcentagem da área de colágeno também foi uma variável avaliada a partir da biópsia realizada no T48 de cada grupo. As médias deste parâmetro nos os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS foram iguais a 35,45%, 37,47% e 39,43%, respectivamente, não apresentando diferença entre os grupos ($p>0,05$), como mostra a Figura 10F.

3.5. Concentração de progesterona

Os níveis séricos de progesterona foram similares ($p>0,05$) entre os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS ($9,52 \pm 1,01$ ng/mL, $6,89 \pm 1,66$ ng/mL e $6,02 \pm 1,28$ ng/mL, respectivamente), conforme observado na Figura 12.

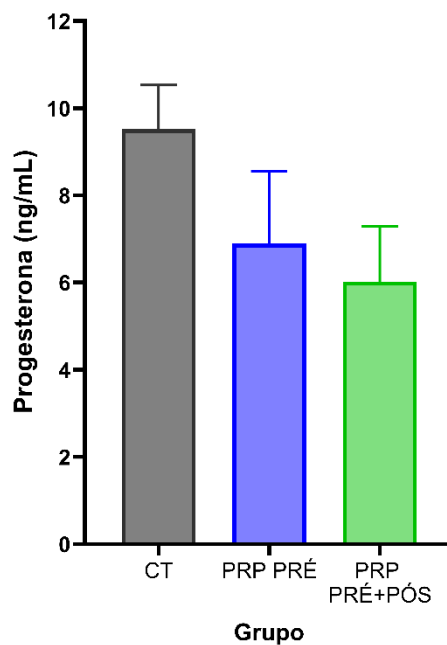


Figura 12. Médias e erros-padrão da concentração sérica de progesterona (ng/mL) avaliada 5 dias após a inseminação artificial com sêmen asinino congelado nos grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS.

3.6. Taxa de fertilidade

Os grupos CT e PRP PRÉ apresentaram 0% (0/11) de taxa de fertilidade, enquanto o grupo PRP PRÉ+PÓS apresentou 10% (1/10). Apesar do diagnóstico de uma prenhez positiva no grupo PRP PRÉ+PÓS, a taxa de fertilidade não diferiu estatisticamente dos demais grupos ($p>0,05$), como indicado pela Tabela 5.

Tabela 5. Médias e erros-padrão da taxa de fertilidade (%) aos 14 dias após inseminação artificial com sêmen asinino congelado entre os grupos CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS.

Tempo	Taxa de fertilidade		
	Grupo		
	CT	PRP PRÉ	PRP PRÉ+PÓS
D14	0% (0/11)	0% (0/11)	10% (1/10)

4. DISCUSSÃO

O uso do PRP foi proposto como um tratamento alternativo por ser um produto, orgânico, atóxico, não imunorreativo, de fácil preparação e baixo custo. Ademais, é uma fonte autógena de fatores de crescimento que podem atuar na regulação do metabolismo celular e sobre a inflamação. O PRP foi administrado antes da IA com o intuito de promover a modulação da resposta inflamatória do ambiente uterino antes mesmo da interação do sêmen, visando diminuir a resposta antigênica ao sêmen. Além disso, a associação da infusão de PRP pré IA à infusão de PRP após a IA teve como objetivo tentar potencializar seus efeitos após o início da resposta inflamatória ocasionada pelo sêmen.

O endométrio das fêmeas equinas e asininas podem apresentar pregas endometriais edemaciadas em função da fase do ciclo estral ou de algum processo inflamatório ocorrendo no útero, como a endometrite pós cobertura. O aumento dos níveis do hormônio estradiol (E2) durante a fase folicular e dos mediadores pró-inflamatórios durante a inflamação causam efeito vasodilatador e alteração da permeabilidade vascular no local, proporcionando extravasamento de exsudato para os espaços intersticiais (DAELS & HUGHES, 1993; LEMMA et al., 2006; SAMPER, 2010). Este extravasamento caracteriza a formação do edema, porém se produzido em excesso pode ultrapassar o limite do interstício e o exsudato pode acumular no lúmen uterino (COLLINS et al., 1999).

A presença de edema discreto a moderado ou moderado a abundante antes e 6 horas após a IA, nos grupos com e sem tratamento, pode ser explicada pela ação do estrógeno circulante (E2) e em decorrência da reação inflamatória ao sêmen, respectivamente. Conseqüentemente, a redução do edema nos tempos 24 e 48 horas após a IA se deve ao controle da inflamação e ao decréscimo de E2 juntamente com a elevação da progesterona, devido ao início do diestro. Entretanto, não foram observados efeitos dos tratamentos com PRP no edema endometrial, corroborando com SEGABINAZZI et al. (2021), que ao testar infusões de PRP

antes (-48h e -24h) e após a IA (6 e 24h) com sêmen fresco em éguas suscetíveis à endometrite também não encontraram diferenças neste parâmetro após a IA do grupo tratado em relação ao controle.

No momento do pico inflamatório, 6 horas após a IA (T6), foi observado aumento do acúmulo de líquido intrauterino em todos os grupos, no entanto, o grupo PRP PRÉ apresentou menor retenção de LIU do que o grupo não tratado (CT). Já o grupo PRP PRÉ+PÓS apresentou valores de LIU iguais ao grupo CT neste momento. Esses resultados sugerem que o tratamento com PRP antes da IA é capaz de modular o acúmulo de exsudato no lúmen uterino, o que não acontece quando este tratamento é realizado quatro horas pós IA. Nesse caso, parte do volume de PRP infundido pós IA, pode ainda estar presente no lúmen uterino no momento da avaliação T6. Apesar disto, todos os grupos apresentaram ausência de LIU entre 24 e 48 horas após a IA, demonstrando que mesmo havendo diferenças entre os grupos no momento do pico inflamatório, a retenção de LIU se resolveu em até 48 horas em todos os grupos. SEGABINAZZI et al. (2017), testando tratamento pré IA (24h antes) e pós IA (4h após a IA) em éguas suscetíveis à EPPC, e ANDINO et al. (2023) utilizando PRP infundido 4h após a IA em éguas saudáveis, também não observaram efeito dos tratamentos com PRP no acúmulo de LIU 24 horas após a IA com sêmen fresco. Em contrapartida, REGHINI et al. (2013), utilizando tratamento 4h após a IA, relataram que o mesmo foi eficaz na redução do acúmulo de LIU 24 horas após a IA com sêmen fresco em éguas suscetíveis à EPPC. Da mesma forma, SEGABINAZZI et al. (2021), relatou redução do acúmulo de LIU 24 e 48 horas após a IA quando as éguas foram tratadas com PRP.

Com o auxílio da ultrassonografia modo Doppler, foi possível detectar aumento da vascularização 6 horas após a IA na região do corno inseminado em todos os grupos avaliados e no corpo uterino nos grupos CT e PRP PRÉ, resultado esperado devido à vasodilatação causada pelo processo inflamatório no útero, porém não foram encontradas diferenças entre os tempos do grupo PRP PRÉ+PÓS. Apesar de não terem sido observadas diferenças quando os grupos foram comparados entre si, os grupos tratados apresentaram redução na vascularização do corno inseminado no T48 em relação ao momento do pico inflamatório (T6), enquanto que no grupo controle o valor obtido no T48 ainda era similar ao T6. Isto pode indicar um possível efeito do PRP na modulação da perfusão sanguínea durante o processo inflamatório, nesta região. Apesar dos espermatozoides serem capazes de percorrer toda a extensão do útero, chegando também ao corno não inseminado, a presença de destes e de PRP não afetaram significativamente a perfusão sanguínea do corno contralateral à ovulação.

Não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados (CT, PRP PRÉ e PRP PRÉ+PÓS) quanto ao número total e no perfil individual de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos, monócitos, linfócitos e basófilos). Estes resultados demonstram que os tratamentos com PRP, antes da IA ou antes e após a IA, não foram eficientes em reduzir a migração de células inflamatórias para o útero pós IA com sêmen asinino congelado. Apesar de não haver diferenças entre os grupos, foi observada uma tendência ($0,05 < p < 0,1$) do tratamento com duas infusões de PRP em apresentar um pico inflamatório menos intenso de neutrófilos em relação ao grupo controle. Em contraste, REGHINI et al. (2013), SEGABINAZZI et al. (2017), SEGABINAZZI et al. (2021) e ANDINO et al. (2023) observaram que o tratamento com PRP foi capaz de reduzir significativamente o número de PMN na citologia endometrial, 24 horas após a IA em éguas suscetíveis à endometrite. FARGHALI et al. (2022) demonstraram após infusões intrauterinas de PRP autólogo durante o diestro com intervalo de 7 dias, diminuição de PMNs e isolados bacterianos, diminuição gradual de líquido nos cornos uterinos e redução da espessura e perfusão vascular uterina, restaurando a aparência normal do endométrio de jumentas com endometrite bacteriana aguda.

Todas as fêmeas incluídas no presente estudo apresentaram citologia endometrial negativa (<5% de células inflamatórias, seguindo a classificação de BROOK, 1993) no tempo controle (TP), previamente à inseminação e ao tratamento. Em todos os grupos, o número de células inflamatórias totais aumentou drasticamente no exame citológico 6 horas após a IA, indicando alcance do pico inflamatório neste momento, ocasionado pela presença do sêmen. Esta rápida resposta antigênica no trato reprodutor feminino, possivelmente resultou na liberação de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias, que culminaram na ativação do endotélio vascular e quimiotaxia de células imunológicas (COLLINS et al., 1999; TROEDSSON et al., 2001; EISENBACH, 2003; KAPLANSKI et al., 2003; KATILA, 2012; CANISSO et al., 2020). No entanto, possivelmente ocorreu um equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios nos tempos subsequentes, já que em todos os grupos, os níveis de células inflamatórias totais no T48 retornaram a valores encontrados no momento TP. Desta forma, na citologia, exame que avalia o perfil de celularidade superficial do endométrio, os valores de células inflamatórias totais e de neutrófilos alcançaram em 48 horas níveis similares ao momento pré IA e tratamento (TP), sugerindo resolução do processo inflamatório. Porém, deve-se também considerar que as porcentagens avaliadas individualmente não retornaram aos valores considerados normais (<5%) no T48, demonstrando redução significativa da inflamação, mas sem resolução completa.

Ao avaliar separadamente o perfil de cada leucócito, observa-se que os neutrófilos foram as principais células encontradas durante a inflamação, correspondendo cerca de 91% a 96% das células inflamatórias totais no T6. Embora não tenha sido observada diferenças entre os grupos, a porcentagem de neutrófilos no grupo CT alcançou valores similares ao TP no T24, já nos grupos tratados a porcentagem de neutrófilos só alcançou valores similares ao TP no T48, sugerindo que o PRP pode ocasionar uma quimiotaxia mais prolongada dessas células.

O presente trabalho apresentou resultados similares aos encontrados na literatura quanto à dinâmica inflamatória e perfil de células encontradas no ambiente uterino pós IA com sêmen congelado, sendo o pico inflamatório de PMNs atingido em 6 horas, com posterior redução entre 24 e 48 horas em jumentas (ROTA et al., 2008; MIRÓ et al., 2011; VILES et al., 2013a; VILES et al 2013b; COSTA et al., 2023), bem como em éguas (TROEDSSON, 1999; KATILA, 2001; CARD, 2005; FIALA et al., 2007; MAISCHBERGER et al., 2008; KATILA, 2012). COSTA et al. (2023) também demonstraram, ao comparar a resposta inflamatória em jumentas, elevação acentuada de células inflamatórias 6 horas após a IA e redução nas horas seguintes, reestabelecimento da proporção de células endometriais e inflamatórias em até 48 horas comparado ao momento antes da IA.

De forma bastante particular, a presença de eosinófilos pode ser considerada fisiológica para o endométrio saudável de jumentas durante o estro e apresentar elevação durante o processo inflamatório após a inseminação (MIRO et al., 2011; VILES et al., 2013a; VILES et al., 2013b; COSTA et al., 2023), enquanto que em éguas a presença de eosinófilos no útero está associada a reações anafiláticas, pneumovagina e infecção fúngica (SLUSHER et al., 1992; SNIDER et al., 2011; VILES et al., 2013a). Porém o significado da presença destas células permanece desconhecido e o seu papel na resposta inflamatória uterina em fêmeas asininas ainda precisa ser determinado. Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos, foram observadas diferenças nas porcentagens desse PMN ao longo do tempo apenas nos grupos tratados, sugerindo um possível efeito do PRP na quimiotaxia de eosinófilos.

No exame citológico, todos os grupos apresentaram aumento da porcentagem de monócitos entre 6 e 24 horas pós IA, apesar de não haver diferenças significativas entre os grupos. No controle esse aumento aconteceu somente 24 horas após a IA, já nos grupos com tratamento esse aumento foi observado precocemente no pico inflamatório (T6). COSTA et al. (2023), ao comparar a resposta inflamatória em jumentas e éguas, observaram maior contagem de monócitos 12 horas após a IA em jumentas e sugeriu possível hiperatividade do sistema imunológico das jumentas, pois os macrófagos podem contribuir para liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (CHEN et al., 2023).

Na avaliação histopatológica, que engloba avaliação de camadas mais profundas, observou-se a persistência da inflamação aguda no último tempo avaliado (T48) em todos os grupos, marcada pela presença acentuada de células PMNs, confirmando que não houve resolução completa do processo inflamatório em nenhum grupo avaliado. Pode-se inferir, portanto, que os tratamentos com PRP não foram eficientes em reduzir a quimiotaxia de neutrófilos e de eosinófilos nos estratos compacto e esponjoso do endométrio. Em contraste, SEGABINAZZI et al. (2021) relataram efeito do PRP na redução do número de neutrófilos em biópsias endometriais, 6 e 24 horas após IA, em éguas suscetíveis à endometrite persistente pós cobertura. No presente estudo, também não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados quanto ao grau de fibrose, quantificação da área de colágeno e de infiltrado linfocitário, aspectos que caracterizam a inflamação crônica, demonstrando que em todos os grupos a inflamação se tratava de um processo agudo.

A presença de eosinófilos no endométrio de jumentas foi considerada um achado normal por alguns autores, como mencionado anteriormente. Porém, sua presença acentuada observada 48 horas após a IA nos EC e EE, tanto nos grupos tratados quanto no controle, é um dado intrigante. Entretanto, como não foram coletadas amostras de biópsia em outros momentos para demonstrar alterações ao longo do tempo, não é possível analisar se o T48 apresentou similaridade ao TP ou ao pico inflamatório para esse e demais PMNs, requerendo mais estudos acerca das mudanças histológicas pós IA em jumentas. COSTA et al. (2022) relataram escore de inflamação aguda (escala de 0 a 6) superior na espécie asinina (escore 3) 12 horas após IA com sêmen asinino congelado quando comparada com a espécie equina (escore 0), porém 48 horas após a IA, ambas as espécies apresentaram escore 0. O presente estudo demonstrou que o PRP não influenciou na concentração de eosinófilos ao nível histológico, sugerindo que os tratamentos não foram capazes de modular a eosinofilia. Utilizando glicocorticoide, CHAPERO et al. (2023) relataram que uma dose única endovenosa de 50 mg de dexametasona no momento da IA em jumentas não diminuiu os PMN na histopatologia, mas diminuiu os eosinófilos, 24 horas após a inseminação com sêmen asinino congelado.

Os eosinófilos apresentam grânulos que contêm uma variedade de proteínas pré-formadas, como citocinas e proteínas principais básicas, incluindo proteína básica maior (MBP), proteína catiônica eosinofílica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), que podem ser liberadas após estimulação e são capazes de destruir microrganismos e causar uma reação de hipersensibilidade, mas também podem induzir lesão e disfunção tecidual devido ao seu alto potencial citotóxico (MELO e WELLER et al., 2010; GEERING et al., 2013; RAMIREZ et al., 2018; WESCHLER et al., 2021). De forma

geral, estes componentes podem causar poros seletivos de íons e insensíveis à voltagem nas membranas das células-alvo, possivelmente facilitando a entrada de outras moléculas citotóxicas, induzir a degranulação de mastócitos e basófilos, alterar as respostas de contração do músculo liso, catalisar reações para formação de espécies de oxigênio altamente reativas e metabólitos reativos de nitrogênio, promovendo incremento do estresse oxidativo e subsequente morte celular por apoptose e necrose, além de além de estimular a secreção de glicosaminoglicanos por fibroblastos (ROTHENBERG e HOGAN, 2006). Com isso, a produção de proteínas granulares de forma excessiva, prolongada ou inadequada está envolvida no desencadeamento de doenças humanas (ROTHENBERG e HOGAN, 2006; RAMIREZ et al., 2018; WESCHLER et al., 2021). Desta forma, a reação eosinofílica pode contribuir para o ambiente uterino inadequado, o que poderia contribuir para a baixa fertilidade das jumentas com sêmen congelado.

O desenvolvimento destas células, bem como a sobrevivência e persistência nos tecidos e sangue são mediados por citocinas. MIRÓ et al. (2020) avaliaram a expressão de IL-33 em amostras de biópsias uterinas de jumentas e sugeriram que esta citocina pode mediar a infiltração eosinófilos após IA e observaram uma relação direta entre a infiltração de eosinófilos nos tecidos e a expressão desta citocina. Apesar do presente estudo não abranger avaliação e regulação sobre citocinas, estas podem ser peças chave na modulação do processo inflamatório. Assim, pesquisas envolvendo o papel de citocinas podem fornecer novos alvos terapêuticos para controle da inflamação uterina em jumentas. SOKKAR et al. (2001) já havia relatado a presença de eosinófilos no endométrio de jumentas com alterações degenerativas crônicas. PAPAS et al. (2017) examinaram jumentas com problemas de fertilidade por biópsias endometriais e compararam com biópsias de jumentas saudáveis durante o estro e 6 horas após a IA. Foi observado maior infiltrado neutrofílico nas biópsias com endométrio altamente degenerativo (19-26%) em comparação com fêmeas saudáveis (1,53%) durante o estro, mas menor do que em fêmeas com endometrite aguda pós-inseminação (87,74%). Além disso, jumentas que já apresentavam endometrose leve ou moderada apresentaram maior quantidade de eosinófilos em comparação a jumentas com endométrio saudável.

Quanto à fertilidade, apesar do grupo PRP PRÉ+PÓS apresentarem taxa de 10% (1/10), enquanto os grupos CT e PRP PRÉ resultaram em 0% (0/11), não houve diferença estatística entre os grupos. Desta forma, ambos os tratamentos testados com PRP não apresentaram efeito sobre a fertilidade das jumentas. FANTINI et al. (2021) obtiveram sucesso no tratamento de duas jumentas diagnosticadas com endometrite crônica e inférteis, empregando uma infusão intrauterina de 20 mL de PRP, o que resultou em diagnósticos positivos de gestação no ciclo

estral subsequente dessas fêmeas. Em éguas, METCALF (2014) observou aumento das taxas de prenhez em éguas suscetíveis à EPPC tratadas com PRP no momento da indução da ovulação em comparação a éguas não tratadas (67% versus 19%, respectivamente). Ao testar dois tratamentos com PRP, 24h antes da IA e 4h após a IA, SEGABINAZZI et al. (2017) demonstraram que as taxas não diferiram entre os grupos após a IA com sêmen fresco, porém quando o tratamento foi considerado uma variável dependente, foi observada maior taxa (64%) em ciclos tratados com PRP, em comparação aos ciclos controle (31%). Ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos de ação do PRP no útero e como o mesmo melhora a receptividade endometrial em éguas, porém alguns autores sugeriram efeito imunomodulador do PRP através da inibição da translocação do fator nuclear kappa B (NF-kB), fator que ativa genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias, incluindo quimiocinas e ciclooxigenase-2 (COX-2) (GIRLING et al., 2007; BENDINELLI et al., 2010; VAN BUUL et al., 2011). Foi relatado menor expressão das citocinas IL-1 β , IL-6, e IL-8 (METCLAF et al., 2012; SEGABINAZZI et al., 2021), iNOS (óxido nítrico-sintase induzida) (METCLAF et al., 2012) e COX-2 (SEGABINAZZI et al., 2017) em éguas suscetíveis tratadas com PRP do que éguas não tratadas. Em mulheres, o PRP pode aumentar a migração e a proliferação de células do endométrio, promover neoangiogênese em pacientes inférteis e regular positivamente genes envolvidos na implantação (MARINI et al., 2016; TANDULWADKAR et al., 2017; AGHAJANOVA et al., 2018).

As taxas nulas de fertilidade obtidas no presente trabalho corroboram com dados da literatura, conforme relatado por OLIVEIRA et al. (2006), ao testarem diferentes crioprotetores, e TRIMECHE et al. (1998), ao utilizarem o glicerol como crioprotetor. VIDAMENT et al. (2009) relataram 11% de taxa de fertilidade de jumentas ao utilizar o sêmen asinino criopreservado, enquanto a IA com sêmen refrigerado resultou em 45% de diagnósticos positivos. Porém, alguns estudos apresentaram taxa de fertilidade superior a obtida pelo presente trabalho, como descrito por OLIVEIRA et al. (2016), que alcançaram 28,26% de fertilidade quando a IA foi realizada 24 horas após a indução da ovulação e repetida a cada 8 horas até a detecção da ovulação no ápice do corno uterino. ROTA et al. (2012) testaram sêmen de jumento criopreservado em INRA-96 e relataram taxa de 20% utilizando glicerol como crioprotetor. Neste estudo, após o descongelamento foi realizada rediluição do sêmen com plasma seminal ou INRA-96, e foram observadas taxas de 61,5% e 23,1%, respectivamente. O etilenoglicol também foi testado como crioprotetor associado a rediluição com INRA-96 e a taxa relatada neste caso foi de 25%. Porém, todas as jumentas do estudo foram inseminadas até duas vezes após a indução e o protocolo foi associado a duas lavagens uterinas pós IA (6 e 10h).

O presente estudo utilizou dose inseminante de 1×10^9 espermatozoides totais depositada no ápice do corno uterino ipsilateral à ovulação. Esta metodologia foi baseada em resultados mais satisfatórios encontrados por OLIVEIRA et al. (2016). Estes autores relataram que o aumento no número de espermatozoides por dose de inseminação com sêmen asinino fresco melhorou as taxas de fertilidade em jumentas ao demonstrar que as taxas de prenhez foram maiores em fêmeas equinas (93%) em comparação com asininas (40%) quando utilizado 500×10^6 espermatozoides viáveis, porém ao aumentar o número de espermatozoides da dose inseminante das jumentas para 1×10^9 espermatozoides viáveis, nenhuma diferença significativa foi observada (73%). Além disso, utilizando sêmen asinino congelado, o mesmo estudo comparou o efeito do local da inseminação em jumentas inseminadas 24 horas após a indução da ovulação e a cada 8 horas até a ovulação (dose de 1×10^9 espermatozoides viáveis) e demonstraram maior taxa de fertilidade quando o sêmen foi depositado no ápice do corno uterino (28,26%) em relação a deposição no corpo uterino (0%).

A concentração de progesterona aumenta rapidamente após a ovulação, atingindo o pico entre 7 a 10 dias como demonstrado por SEGABIZAZZI et al. (2022) em fêmeas asininas cíclicas e gestantes, porém o processo inflamatório pode induzir a produção de $PGF2\alpha$, o que pode acarretar em luteólise prematura e afetar as concentrações de progesterona (TROEDSSON, 1999; CANISSO et al., 2020). No presente estudo, as médias das concentrações séricas de P4 apresentaram valores similares entre os grupos, indicando que os tratamentos realizados não interferiram neste parâmetro. Os resultados encontrados são compatíveis para a manutenção da gestação (2,5 ng/ml) e superiores ao relatado por FARGHALI et al. (2022) (3,84 a 4,65 ng/mL) em jumentas com endometrite aguda e bacteriana avaliadas durante o diestro. No entanto, os resultados são inferiores aos observados por DIAZ DURAN et al. (2017) e PANZANI et al. (2018) que relataram valores próximos ou superiores a 20 ng/mL em jumentas no 5 dias após a ovulação.

Apesar de alguns estudos demonstraram efeito benéfico do PRP na modulação da reação inflamatória após a IA em éguas, mediante redução do líquido, da contagem de células inflamatórias e do aumento das taxas de fertilidade, no presente estudo este mesmo efeito não foi observado em jumentas. O tratamento único de PRP pré IA apresentou efeito no acúmulo de líquido intrauterino durante o pico inflamatório, não foi observado efeito para as demais variáveis e nos outros tempos avaliados. As particularidades do aparelho genital da jumenta, associadas a uma reação inflamatória mais exacerbada e presença abundante de infiltrado neutrofílico e eosinofílico, podem explicar o insucesso na utilização do PRP para mitigação dos parâmetros estudados. As fêmeas asininas apresentam maior inclinação do vestíbulo vaginal,

vulva abaixo do assoalho pélvico, cérvix relativamente mais longa e tortuosa e menor drenagem uterina do que as éguas, características estas que podem facilitar a persistência da endometrite (VENDRAMINI et al., 1998; SOKKAR et al., 2001; RENNER-MARTIN et al., 2009; CANISSO et al., 2019). Assim, um maior conhecimento da fisiologia e mecanismos de limpeza uterina e resposta inflamatória poderiam auxiliar no desenvolvimento de melhores protocolos de tratamentos para seu controle, o que poderia beneficiar as taxas de fertilidade nesta espécie.

Mais estudos quanto à resposta humoral, participação de citocinas pró e anti-inflamatórias e estudos mais prolongados são necessários para identificar a qualidade do ambiente uterino até o momento da descida do embrião. Além disso, a existência de diversos protocolos para obtenção do PRP em diferentes espécies gera diferentes resultados e dificulta a padronização e a comparação entre os trabalhos. Para asininos, observa-se ainda uma necessidade de estudos referentes a protocolos de preparo de PRP específico.

5. CONCLUSÕES

Conclui-se que os tratamentos testados com PRP (pré e pré e pós IA) não foram capazes de modular a inflamação uterina pós IA com sêmen asinino congelado em jumentas, pois não afetaram significativamente o influxo de células inflamatórias para o lúmen (tanto ao nível citológico como histológico), a presença de edema endometrial e a perfusão sanguínea no útero. Além disso, os tratamentos não foram eficientes em elevar a taxa de fertilidade, apresentando em todos os grupos resultados insatisfatórios.

Reforça-se mais uma vez a dificuldade em mitigar a resposta inflamatória uterina após IA com sêmen asinino congelado em jumentas e a necessidade de encontrar alternativas para seu controle, com o objetivo de viabilizar o uso desta biotecnologia nesta espécie. Assim mais estudos quanto a outras doses, volumes e métodos de preparo do PRP, além da associação a outras terapias, são desejáveis para uma melhor inferência quanto a eficácia desta terapia na resposta inflamatória uterina de em fêmeas asininas.

REFERÊNCIAS

Aghajanova L, Houshdaran S, Balayan S, Manvelyan E, Irwin JC, Huddleston HG, Giudice LC. In vitro evidence that platelet-rich plasma stimulates cellular processes involved in endometrial regeneration. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35:757-70.

Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord.* 2017;4(1):18–24.

- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004;91(1):4-15.
- Andino AP, Cumbicus AM, Affonso FJ, Serrano-Recalde EC. Mitigation of post breeding endometritis in mares treated with platelet rich plasma. *J Equine Vet Sci.* 2023;125:104688.
- Bendinelli P, Matteucci E, Dogliotti G, Corsi MM, Banfi G, Maroni P, et al. Molecular basis of anti-inflammatory action of platelet-rich plasma on human chondrocytes: Mechanisms of NF- κ B inhibition via HGF. *J Cell Physiol.* 2010;225(3):757-66.
- Brook D. Uterine cytology. In: McKinnon AO, Voss JL, editors. *Equine Reproduction.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 246-53.
- Canisso IF, Carvalho GR, Morel MD, Ker PG, Rodrigues AL, Silva EC, et al. Seminal parameters and field fertility of cryopreserved donkey jack semen after insemination of horse mares. *Equine Vet J.* 2011;42(2):179-83.
- Canisso IF, Panzani D, Miró J, Ellerbrock RE. Key aspects of donkey and mule reproduction. *Vet Clin Equine Pract.* 2019;35(3):607-42.
- Canisso IF, Segabinazzi LGTM, Fedorka E. Persistent breeding-induced endometritis in mares—a multifaceted challenge: From clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. *Int J Mol Sci.* 2020;21:1432.
- Card C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. *Theriogenology.* 2005;64:580-88.
- Carneiro GF, Lucena JEC, Barros LO. The current Situation and Trend of the Donkey Industry in South America. *J Equine Vet Sci.* 2018;65:106-10.
- Centeno LA. Remodelação tecidual no endométrio equino: fibras de colágenos e colagenases [Master's thesis]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2019.
- Chapero L, Rossetto L, Sánchez J, Bilbao MG, Losinno L. Dexamethasone's effect on endometrial inflammatory response in jennies after artificial insemination with frozen donkey semen. *J Equine Vet Sci.* 2023;125:104701.
- Chen S, Saeed AF, Liu Q, Jiang Q, Xu H, Xiao GG, et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther.* 2023;8:207.
- Collins T, Contran RS, Kumar V. *Robbins Pathologic Basic of Disease*, 6th ed. Philadelphia, PA, USA: W. B. Saunders; 1999.
- Costa LML. Avaliação da resposta inflamatória uterina em jumentas e éguas inseminadas com sêmen criopreservado de asininos [Master's thesis]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2022.
- Costa LML, Sancler-Silva YFR, Albino MV, Fontes CS, Teixeira CS, Freitas MS, et al. Does the uterine inflammatory response differ between mares and donkey jennies inseminated with frozen donkey semen? *J Equine Vet Sci.* 2023;125:104703.

Daels PF, Hughes JP. The normal estrous cycle. In: McKinnon, A.O.; Voss, J.L. (eds.) Equine reproduction. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 121-32.

Díaz-Duran M, Zarco L, Boeta AM. Ovarian dynamics and estrous cycle length in the donkey (*Equus asinus*). *Theriogenology*. 2017;103:1-8.

Diaz-Jimenez M, Rota A, Dorado J, Consuegra C, Pereira B, Camillo F, et al. First pregnancies in jennies with vitrified donkey semen using a new warming method. *Animal*. 2021;15(1):100097.

Eisenbach M. Why are sperm cells phagocytosed by leukocytes in the female genital tract?. *Med Hypotheses*. 2003;60(4):590-2.

Fantini P, Jiménez R, Vilés K, Iborra A, Palhares MS, Catalán J, et al. Simple Tube Centrifugation Method for Platelet-Rich Plasma (PRP) Preparation in Catalonian Donkeys as a Treatment of Endometritis-Endometrosis. *Animals*. 2021;11(10):2918.

Farghali HA, Abdelkader NA, Fathi M, Emam IA, Abubakr HO, Alijuaydi SH, et al. The efficiency of intrauterine infusion of platelet-rich plasma in the treatment of acute endometritis as assessed by endoscopic, Doppler, oxidative, immunohistochemical, and gene expression alterations in jennies. *Theriogenology*. 2022;181:147-60.

Fiala SM, Pimentel CA, Mattos ALG, Gregory RM, Mattos RC. Effect of sperm numbers and concentration on sperm transport and uterine inflammatory response in the mare. *Theriogenology*. 2007;67:556-62.

Fiala SM, Cruz LA, Rodrigues R, Jobim MIM, Gregory RM, Mattos RC. Sperm cells in the reproductive tract of the mare: where can we find them? *Pferdeheilkunde*. 2010;26:19-21.

Gastal E, Gastal M, Ginther O. The suitability of echotexture characteristics of the follicular wall for identifying the optimal breeding day in mares. *Theriogenology*. 1998;50(7):1025-38.

Geering B, Stoeckle C, Conus S, Simon HU. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. *Trends in immunology*. 2013;34(8):398-409.

Ginther OJ. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 2nd ed; 1992

Girling JE, Hedger MP. Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunol Cell Biol*. 2007;85:481-9.

Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*. 2003;24(1):25-29.

Katila T. In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: A review. *Acta Vet Scand*. 2001;42(2):1-17.

Katila T. Post-mating Inflammatory Responses of the Uterus. *Reprod Domest Anim*. 2012;47(5):31-41.

- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T. Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*. 1994;41(3):629-36.
- Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy. In: Morrow DA, ed. *Current Therapy in Theriogenology*. W.B. Saunders Company; 1986. p. 726-29.
- Kugler W, Grunenfelder HP, Broxham E. *Donkey breeds in Europe*. Monitoring Institute for Rare Breeds and Seeds in Europe, St. Gallen, Switzerland; 2008.
- LeBlanc M, Causey R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. *Reprod Domest Anim*. 2009;44:10–22.
- Lemma A, Schwartz HJ, Bekana M. Application of ultrasonography in the study of the reproductive system of tropical jennies (shape *Equus asinus*). *Trop Anim Health Prod*. 2006;38:267-74.
- Maischberger E, Irwin JA, Carrington SD, Duggan VE. Equine post-breeding endometritis: A review. *Ir Vet J*. 2008;61:1-6.
- Marini MG, Perrini C, Esposti P, Corradetti B, Bizzaro D, Riccaboni P, et al. Effects of platelet-rich plasma in a model of bovine endometrial inflammation in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2016;14:1-17.
- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP). What is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*. 2001; 10(4): 225-28.
- Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004;62:489-96.
- Melo RC, Weller PF. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. *Histol Histopathol*. 2010;25(10):1341.
- Metcalf ES, Scoggin K, Troedsson MHT. The effect of platelet-rich plasma on endometrial pro-inflammatory cytokines in susceptible mares following semen deposition (Abstract). *J Equine Vet Sci*. 2012;32(8):498.
- Metcalf ES. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to persistente mating-induced endometritis (PMIE). *J Equine Vet Sci*. 2014;34:128.
- Miró J, Vilés K, Fernández M, Fábregas N, Soares J, García W. Induced acute endometritis by frozen semen insemination in donkey. *Anim Reprod Sci*. 2011;46:130.
- Miró J, Papas M. Post–Artificial Insemination Endometrial Inflammation and Its Control in Donkeys. *J Equine Vet Sci*. 2018;65:38-43.
- Miró J, Marín H, Catalán J, Papas M, Gacem S, Yeste M. Seminal Plasma, Sperm Concentration, and Sperm-PMN Interaction in the Donkey: An In Vitro Model to Study Endometrial Inflammation at Post-Insemination. *Int J Mol Sci*. 2020;21:3478.

Morris LHA, McCue PM, Aurich C. Equine endometritis: A review of challenges and new approaches. *Reproduction*. 2020;160(5):R95-R110.

Oliveira JV, Alvarenga MA, Melo CM, Macedo LM, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim Reprod Sci*. 2006; 94 (1-4): 82-4.

Oliveira JV, Pedro Victor de Luna Freire Oliveira PVL, Oña CMM, Guasti PN, Monteiro GA, Sancler-Silva YFR, Papa PM, Alvarenga MA, Dell'Aqua Junior JA, Papa FO. Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen. *Theriogenology*. 2016;85(7):1267-73.

Oliveira SN, Canuto L, Segabinazzi LGTM, Dell Aqua Junior JA, Papa P, Fonseca M, et al. Histrelin acetate-induced ovulation in Brazilian Northeastern jennies (*Equus asinus*) with different follicle diameters. *Theriogenology*. 2019;136:95-100.

Panzani D, Tardella M, Govoni N, Tesi M, Fanelli D, Rota A. Effect of the administration of alfaprostol 3 or 6 days after ovulation in jennies: ultrasonographic characteristic of corpora lutea and serum progesterone concentration. *Theriogenology*. 2018;121:175-80.

Papa FO, Dell'Aqua Junior JA, Alvarenga MA, Melo CM, Soares ZF, Lopes MD. Use of corticosteroid therapy on the modulation of uterine inflammatory response in mares after artificial insemination with frozen semen. *Pferdeheilkunde*. 2008;24:79–82.

Papas M, Noto F, Bonilla S, Marín H, Miró J. Histological findings from endometrium biopsies in jennies. *Reprod Dom Anim*. 2017;52(3):121.

Pimentel CA, Santos PFM, Alves NA, Hammes AM. Biópsia endometrial em equinos. In: *Laboratório Regional de diagnóstico - UFPel. Doenças diagnosticadas*. Pelotas, RS: Editora e gráfica Universitária; 1989. p. 47-64.

Ramirez GA, Yacoub MR, Ripa M, Mannina D, Cariddi A, Saporiti N, et al. Eosinophils from physiology to disease: a comprehensive review. *BioMed research international*. 2018;2018(1):9095275.

Reghini MFS. Efeito do tratamento com plasma rico em plaquetas em éguas resistentes e susceptíveis à endometrite persistente após inseminação artificial [Master's thesis]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2013.

Reghini MFS, Neto CR, Segabinazzi LG, Castro Chaves MMB, Dell'Aqua CPF, Bussiere MCC, et al. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. *Theriogenology*. 2016;86(2):516-22.

Renner-Martin TFP, Forstenpointner G, Weissengruber GE, Eberhardt L. Gross Anatomy of the Female Genital Organs of the Domestic Donkey (*Equus asinus* Linné, 1758). *Anat Histol Embryol*. 2009;38(2):133-8.

Rota A, Magelli C, Panzani D, Camillo F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiana donkey spermatozoa. *Theriogenology*. 2008;69(2):176-85.

Rota A, Panzani D, Sabatini C, Camilo F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: Studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*. 2012;78(8):1846–54.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147–74.

Samper JC. A review of a practitioner's perspective on endometrial edema. *Pferdeheilkunde*. 2010;26(1):14-8.

Schoon HA, Schoon D, Klug E. Uterusbiopsien als Hilfsmittel für Diagnose und Prognose von Fertilitätsstörungen der Stute. *Pferdeheilkunde*. 1992;8:355-62.

Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho A, Dell'Aqua Jr JA, Miró J, et al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich plasma before and after AI. *Theriogenology*. 2017;104:120-26.

Segabinazzi LGTM, Canisso IF, Podico G, Cunha LL, Novello G, Rosser MF, et al. Intrauterine blood plasma platelet-therapy mitigates persistent breeding-induced endometritis, reduces uterine infections, and improves embryo recovery in mares. *Antibiotics*. 2021;10(5):490.

Segabinazzi LG, Roberts BN, Peterson EW, Ambrosia R, Bergfelt D, Samper J, et al. Early pregnancy in jennies in the Caribbean: corpus luteum development and progesterone production, uterine and embryo dynamics, conceptus growth and maturation. *Animals*. 2022;12(2):127.

Silva LA, Ginther OJ. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares. *Biol Reprod*. 2006;74:337-43.

Slusher SH, Cowell RL, Tyler RD. The Endometrium. In: Cowell RL, Tyler RD, eds. *Cytology and Hematology of the Horse*. Maryland Heights, MO, USA: American Veterinary Publications; 1992. p. 173–80.

Sokkar SM, Hamouda MA, El-Rahman SM. Endometritis in she donkeys in Egypt. *J Vet Med Series B*. 2001;48(7):529-36.

Snider TA, Sepoy C, Holyoak GR. Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*. 2011;75(9):1567-81.

Tandulwadkar S, Naralkar M, Surana A, Selvakarthick M, Kharat A. Autologous intrauterine platelet-rich plasma instillation for suboptimal endometrium in frozen embryo transfer cycles: A pilot study. *J Hum Reprod Sci*. 2017;10:208-12.

Trimeche A, Renard P, Tainturier D. A procedure for Poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology*. 1998;50(5):793-806.

Troedsson MHT. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*. 1999;52:461-71.

- Troedsson MH, Loset K, Alghamdi AM, Dahms B, Crabo BG. Interaction between equine semen and the endometrium: the inflammatory response to semen. *Anim Reprod Sci.* 2001;68(3-4):273-78.
- Van Buul GM, Koevoet WLM, Kops N, Bos PK, Verhaar JAN, Weinans H, et al. Platelet-Rich Plasma Release Inhibits Inflammatory Processes in Osteoarthritic Chondrocytes. *Am J Sports Med.* 2011; 39(11): 2362-70.
- Vendramini O, Guintard C, Moreau J, Tainturier D. Cervix conformation: A first anatomical approach in baudet du poitou jenny asses. *Anim Sci.* 1998;66(3):741-4.
- Viana JH, Dorea MD, Siqueira LG, Arashiro EK, Camargo LS, Fernandes CA, et al. Occurrence and characteristics of residual follicles formed after transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in cattle. *Theriogenology* 2013;79:267–73.
- Vidament M, Vicent P, Martin FX, Magistrini M, Blesbois E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci.* 2009;112(1-2):22-35.
- Viles K, Rabanal R, Rodriguez-Prado M, Snni J. Effect of ketoprofen treatment on the uterine inflammatory response after AI of jennies with frozen semen. *Theriogenology.* 2013a;79(7): 1019-26.
- Viles K, Rabanal R, Rodríguez-Prado M, Miró J. Influence of seminal plasma on leucocyte migration and amount of COX-2 protein in the jenny endometrium after insemination with frozen-thawed semen. *Anim Reprod Sci.* 2013b;143:57-63.
- Watson ED. Post-breeding endometritis in the mare. *Anim Reprod Sci.* 2000a;60-61:221-32.
- Watson PF. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000b;60-61:481-92.
- Wechsler ME, Munitz A, Ackerman SJ, Drake MG, Jackson DJ, Wardlaw AJ, et al. Eosinophils in health and disease: a state-of-the-art review. *Mayo Clinic Proceedings.* 2021;96(10):2694-707.
- Woodward EM, Christoffersen M, Campos J, Squires EL, Troedsson MHT. Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. *Theriogenology.* 2012;78(3):495-501.
- Woodward EM, Troedsson MH. Equine breeding-induced endometritis: A review. *J Equine Vet Sci.* 2013;33(9):673-82